

Aus der
Klinik für Allgemein- Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. P. Neuhaus)

HABILITATIONSSCHRIFT

Die Bedeutung von intraepithelialen Lymphozyten, oxidativem Streß und endogenen Schutzmechanismen für die Integrität der intestinalen Mukosa

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Chirurgie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Humboldt Universität zu Berlin

von
Dr. med. Natascha C. Nüssler

Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K.W. Jauch, Universität Regensburg

2. Prof. Dr. med. M.F. Neurath, Universität Mainz

Datum der Einreichung: 27. Mai 2001

Datum der Habilitation: 06. Nov. 2001

Abstrakt

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von intraepithelialen Lymphozyten (IEL), oxidativem Streß und endogenen Schutzmechanismen bei GvHR, Dünndarmtransplantation, Sepsis, Morbus Crohn sowie intestinalem Ischämie/Reperfusionsschaden (I/RS) analysiert. Die Bestimmung der phänotypischen und funktionellen Charakteristika der IEL im Rahmen der o. g. Erkrankungen wies auf eine Selektion bestimmter T-Zell Subpopulationen in der Darmschleimhaut hin. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß IEL nicht nur als Effektorzellen zur mukosalen Barrierefunktion beitragen, sondern auch regulierende Funktionen bei weiteren Abwehrmechanismen der Darmschleimhaut, wie z.B. der NOS-2 Expression besitzen. Die Untersuchungen zum intestinalen I/RS zeigten eine Gewebeschädigung nicht nur im Darm sondern auch der Leber nach selektiver intestinaler Ischämie. Dabei konnte in beiden Organen oxidativer Streß als ein Faktor der Gewebeschädigung nachgewiesen werden. Bei der Modulation des I/RS durch Gabe von Zytokinen konnte eine Zunahme des I/RS durch Gabe von IL-10 und eine Abnahme des I/RS durch IL-2 erreicht werden. Der positive Effekt der IL-2 Gabe war von einer verstärkten und verlängerten NOS-2 mRNA Expression sowie einer gesteigerten NO-Freisetzung begleitet. Im Gegensatz dazu fehlte nach IL-10 Gabe die Zunahme der NOS-2 Expression ebenso wie ein Anstieg der NO-Metabolite im Serum. Die verminderte NO-Produktion könnte somit den negativen Effekt des anti-inflammatorischen IL-10 auf den I/RS erklären.

Schlagworte

Dünndarm

Intraepitheliale Lymphozyten

Ischämie / Reperfusionsschaden

NOS-2

Abstract

In this study, the role of intraepithelial lymphocytes (IEL) was analyzed in Graft-versus-Host disease, small bowel transplantation, sepsis and inflammatory bowel disease. Furthermore, the influence of oxidative stress and endogenous protective mechanisms on the development of intestinal ischemia/reperfusion injury was determined. The phenotypic and functional characteristics of IEL in these diseases indicated that only specific T-cell subsets selectively migrate and/or survive in the intestinal mucosa. In addition, it was demonstrated that IEL display several functions in the intestinal barrier system: they are cytolytic effector cells, but do also exert regulatory functions on the expression of mucosal host defense mechanisms such as NOS-2 expression. The investigations on intestinal ischemia / reperfusion injury revealed that selective intestinal ischemia induces tissue injury not only in the intestine, but in the liver as well. In both organs, oxidative stress plays a predominant role in the development of tissue destruction. Modulation of I/RS by administration of cytokines lead to increased tissue damage after IL-10 administration and reduced tissue injury after IL-2 administration. The beneficial effect of IL-2 may have been due to an increased NOS-2 mRNA expression and the subsequently increased NO production. In contrast, IL-10 administration failed to induce an increased NOS-2 mRNA expression or NO production in the intestine and liver.

Keywords

small intestine

intraepithelial lymphocytes

ischemia / reperfusion injury

NOS-2

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	PHÄNOTYP UND FUNKTION INTRAEPITHELIALER LYMPHOZYTEN	8
1.2	IEL NACH DÜNNDARMTRANSPLANTATION.....	10
1.3	IEL BEI GRAFT-VERSUS-HOST-REAKTION	11
1.4	IEL BEI SEPSIS	13
1.5	IEL BEI MORBUS CROHN.....	14
1.6	INTESTINALE ISCHÄMIE-REPERFUSION	15
2	FRAGESTELLUNG	19
3	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	PATIENTEN.....	20
3.2	TIERE.....	20
3.3	KRANKHEITSMODELLE	21
3.3.1	Dünndarmtransplantation.....	21
3.3.2	Akute Graft-versus-Host-Reaktion.....	21
3.3.3	Sepsis	22
3.3.4	Intestinale Ischämie/Reperfusion	22
3.4	ZELLISOLIERUNG.....	23
3.4.1	Intraepitheliale Lymphozyten	23
3.4.2	Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten	25
3.4.3	Humane periphere Blutlymphozyten	25
3.5	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	25
3.5.1	Verwendete Antikörper	27
3.6	BESTIMMUNG DER ZYTOLYTISCHEN AKTIVITÄT ISOLIERTER LYMPHOZYTEN.....	28
3.7	BESTIMMUNG DER IFN- γ KONZENTRATION.....	29
3.8	BESTIMMUNG VON ASPARTAT-AMINOTRANSFERASE UND HYALURONSÄURE	30
3.9	BESTIMMUNG DER STICKSTOFFMONOXIDDERIVATE NITRIT UND NITRAT.....	30
3.10	BESTIMMUNG DER GLUTATHIONGEWEBEKONZENTRATION	31
3.11	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	32
3.12	RT-PCR ANALYSE DER NOS-2 UND HO-1MRNA-EXPRESSION	32
3.12.1	Quantifizierung der Gen-Expression	34
3.13	NORTHERN BLOT ANALYSE DER NOS-2 mRNA-EXPRESSION.....	35
3.14	STATISTIK	36

4	ERGEBNISSE	38
4.1	IEL NACH DÜNNARMTRANSPLANTATION.....	38
4.1.1	Phänotyp	38
4.1.2	Zytotoxizität.....	40
4.2	IEL BEI AKUTER GRAFT VERSUS HOST REAKTION	44
4.2.1	Phänotyp	44
4.2.2	Zytotoxizität.....	50
4.3	IEL BEI SEPSIS	53
4.3.1	Zytotoxizität.....	53
4.3.2	Phänotyp	55
4.3.3	Zytokinproduktion	56
4.3.4	NOS-2 Expression	57
4.4	IEL BEI MORBUS CROHN.....	58
4.4.1	Phänotyp	59
4.4.2	Zytotoxizität.....	62
4.5	INTESTINALE ISCHÄMIE/REPERFUSION.....	64
4.5.1	Ausmass der Gewebeschädigung.....	64
4.5.2	Glutathionhaushalt.....	65
4.5.3	Modulation des I/R-Schadens	66
4.5.4	Endogene Schutzmechanismen	71
5	DISKUSSION	77
5.1	DÜNNARMTRANSPLANTATION UND GRAFT VERSUS HOST REAKTION	77
5.2	LPS-INDUZIERTER SEPSIS	84
5.3	MORBUS CROHN	88
5.4	INTESTINALE ISCHÄMIE/REPERFUSION.....	92
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	LITERATURVERZEICHNIS	103
8	ANHANG	122
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	122
	DANKSAGUNG	124
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	125

1 EINLEITUNG

Der Gastrointestinaltrakt enthält eine der größten Lymphozytenpopulationen des menschlichen Körpers: in jedem Meter Darm sind mehr als 10^{10} Immunglobulin produzierende Zellen enthalten und im Epithel der Darmschleimhaut ist jede sechste Zelle ein Lymphozyt (1). Diese intraepithelialen Lymphozyten (IEL) sind erst in den 80er Jahren in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Zunächst waren es die phänotypischen Besonderheiten der IEL, die diese Zellen für Immunologen interessant machten. Während sich die restlichen Lymphozytenpopulationen des sog. „gut associated lymphoid tissue“ (GALT), die Lymphozyten der Lamina propria (LPL), die Lymphozyten der Peyer'schen Plaques (PPL) sowie die Lymphozyten der mesenterialen Lymphknoten (MLNL) nicht wesentlich von anderen peripheren Lymphozytenpopulationen unterscheiden (2,3), besitzen IEL phänotypische Charakteristika, die sie erheblich von anderen Lymphozyten abgrenzen (4,5). Neben einer ungewöhnlichen Verteilung der reifen Lymphozytensubpopulationen enthalten IEL auch zahlreiche unreife, sonst nur im Thymus anzutreffende Lymphozyten. Der Nachweis dieser unreifen Zellen in der Darmschleimhaut führte zur Hypothese einer thymusunabhängigen T-Zellreifung im Darm. Bestätigt wurde diese Hypothese, als in neonatal thymektomierten Mäusen, die eigentlich keine reifen T-Zellen besitzen, reife T-Zellen im Darm gefunden wurden (6,7). Aufgrund dieser Beobachtungen mußte das bis dahin gültige Dogma der alleinigen T-Zellreifung im Thymus als widerlegt gelten.

Neben diesen phänotypischen und ontogenetischen Besonderheiten weisen IEL auch funktionelle Charakteristika auf, die sie von anderen Lymphozyten unterscheiden und für eine immunologische Überwachungsfunktion in der Darmschleimhaut prädestinieren: die Hypothese einer „first line of defense“ der IEL im mukosalen Immunsystem entstand (8,9).

Aber trotz einer weitgehenden Beschreibung der physiologischen Charakteristika der IEL bezüglich Phänotyp, Ontogenese und Funktion, war die Bedeutung dieser hochspezialisierten Zellen im Rahmen verschiedener Erkrankungen zu Beginn dieser Arbeit weitgehend unklar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher u. a. versucht werden, die Funktion der IEL bei einigen dieser Erkrankungen zu charakterisieren.

1.1 PHÄNOTYP UND FUNKTION INTRAEPITHELIALER LYMPHOZYTEN

IEL liegen in direkter Nachbarschaft der Epithelzellen in der Darmschleimhaut nahe dem Darmlumen. Sie bestehen fast ausschließlich aus $CD3^+$ T-Zellen, deren überwiegender Anteil $CD8^+$ ist und enthalten weder B-Zellen noch Makrophagen (4,10). Demgegenüber enthalten die übrigen Lymphozytenpopulationen des GALT oder des peripheren Blutes weniger als 40% T-Zellen, die vornehmlich einen $CD4^+CD8^-$ Phänotyp aufweisen (3). Neben diesem Übergewicht an $CD8^+$ T-Zellen unterscheiden sich IEL noch in weiteren Punkten von peripheren Lymphozyten:

- IEL enthalten einen erheblichen Prozentsatz an doppelt positiven ($CD4^+CD8^+$) und doppelt negativen ($CD4^-CD8^-$) unreifen Lymphozyten (5). Je nach Spezies schwankt der Anteil dieser unreifen Zellen, die sonst nur im Thymus anzutreffen sind, zwischen 10% und 20%.
- weniger als 40% der $CD8^+$ IEL exprimieren das für periphere T-Zellen typische CD8 Molekül, das aus einem membranständigen α/β Heterodimer ($CD8\alpha\beta$) besteht. Über die Hälfte der $CD8^+$ IEL weisen hingegen ein homodimeres, aus zwei α Ketten gebildetes CD8 Molekül ($CD8\alpha\alpha$) auf (4,11).
- IEL und periphere T-Zellen differieren auch in der Struktur ihres T-Zell-Rezeptors (TCR). Die T-Zellen des peripheren Immunsystems exprimieren an ihrer Zelloberfläche fast ausschließlich einen TCR, der aus einer α und einer β Kette gebildet wird ($\alpha\beta$ TCR), wohingegen ein großer Anteil der IEL einen TCR exprimiert, der aus einer γ und einer δ Kette gebildet wird ($\gamma\delta$ TCR) (11-13). Allerdings schwankt der prozentuale Anteil an $\gamma\delta$ TCR $^+$ Zellen in der Darmmukosa beträchtlich zwischen verschiedenen Spezies. So sind bei Mäusen bis über 50% der IEL $\gamma\delta$ TCR $^+$ (14), wohingegen beim Menschen der Anteil an $\gamma\delta$ TCR $^+$ Lymphozyten in der Darmmukosa bei weniger als 30% liegt (15,16).

IEL lassen sich somit entsprechend der Expression von CD4, CD8, der Struktur ihres CD8 Moleküls ($\alpha\beta$ versus $\alpha\alpha$) oder ihres TCR ($\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$) in zahlreiche Untergruppen aufteilen. Dabei finden sich auch Subtypen, die in anderen peripheren Lymphozytenpopulationen nicht nachweisbar sind, wie z.B.

CD8 $\alpha\alpha^+$ $\gamma\delta$ TCR $^+$ Zellen. Diese „darmspezifischen“ Subtypen weisen auf eine thymusunabhängige T-Zellreifung im Darm hin (6,11,17). Im Rahmen dieses thymusunabhängigen Reifungsprozesses wandern unreife Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in die Darmschleimhaut und reifen dort über die Zwischenstufen der doppelt negativen und doppelt positiven Zellen zu IEL. Die thymusunabhängigen IEL tragen überwiegend den homodimeren CD8 $\alpha\alpha$ Rezeptor und sind zu etwa gleichen Teilen $\alpha\beta$ TCR $^+$ oder $\gamma\delta$ TCR $^+$ (18). Zu den Besonderheiten der thymusunabhängigen T-Zellreifung gehören die eingeschränkte positive und negative Selektion der Lymphozyten. Bei der thymusabhängigen T-Zellreifung führt diese Selektion im Thymus zur Eliminierung autoreaktiver Zellen, während eine mangelhafte Selektion bei der thymusunabhängigen T-Zellreifung den hohen Anteil potentiell autoreaktiver Zellen im intraepithelialen Kompartiment erklären könnte (6,19).

Allerdings reift nur ein Teil der IEL im Darm. IEL, die den heterodimeren CD8 $\alpha\beta$ Rezeptor exprimieren und meist $\alpha\beta$ TCR $^+$ sind, scheinen analog anderer peripherer Lymphozyten die verschiedenen Stadien der T-Zellreifung im Thymus zu durchlaufen und erst danach in den Darm zu wandern (20).

IEL unterscheiden sich auch funktionell von den restlichen Lymphozyten des GALT und von den T- Zellen des peripheren Immunsystems. So reagieren IEL in vitro nur schwach auf Mitogene wie Concavalin A, PMA oder Ionophore (wie z.B. Ionomycin), wohingegen diese Stimuli sehr effektiv die Proliferation peripherer Lymphozyten bewirken können (21). Ebenso ist die proliferative Antwort auf die Stimulierung durch CD3/TCR vermittelte Signale bei IEL schwächer ausgeprägt als bei T-Zellen des peripheren Immunsystems (21-23). Andererseits sind IEL in der Lage, nach Stimulation durch Mitogene oder TCR-vermittelte Signale verschiedene Zytokine, wie IL-3 (8), IL-4 (24), IL-5 (9,25) und IFN- γ (9,24-27) zu produzieren.

Es wird daher vermutet, daß IEL als zytokinproduzierende Zellen regulatorische Funktionen bei der Immunantwort im Darm haben. Möglich ist dabei sowohl die Initiierung von Abwehrmechanismen zur Infektions- und Tumorerabwehr, wie z.B. die Produktion von Stickstoffmonoxid durch Epithelzellen (28), als auch die Erhaltung der mukosalen IgA Antwort bei gleichzeitig bestehender oraler Toleranz

(10,13,29).

Die besonders charakteristische Eigenschaft der IEL ist jedoch ihre ausgeprägte spontane zytolytische Aktivität, die sich vermutlich gegen alterierte oder entartete Epithelzellen richtet (12,21,23,30-32). Während zirkulierende periphere T-Zellen mit der Ausnahme von NK-Zellen per se keine zytotoxische Aktivität aufweisen und erst nach antigener Stimulation zu zytotoxischen Zellen, den sog. CTL (cytotoxic T lymphocytes) reifen, scheinen IEL keinen äußeren antigenen Stimulus zu benötigen, um ihre zytolytische Aktivität zu entwickeln (33). So zeigen selbst IEL von keimfrei aufgezogenen Mäusen eine ausgeprägte spontane nicht spezifische zytolytische Aktivität (32).

Die Bedeutung dieser zytolytischen Aktivität ist bislang nicht eindeutig geklärt. Die Beobachtung, daß Antigene bakteriellen (26,34) oder viralen Ursprungs (35-37), heat-shock Proteine (38), und sog. nicht-klassische, streß-induzierbare MHC Moleküle auf Epithelzellen (39) von zytolytischen IEL erkannt werden können, führte zu der Vermutung, daß IEL eine sog. „first line of defense“ der Darmmukosa darstellen. Im Rahmen dieser Verteidigungsfunktion sollen IEL nicht nur Infektionen durch die Beseitigung infizierter Epithelzellen bekämpfen können, sondern auch der Entwicklung gastrointestinaler Tumoren durch Lyse entarteter Darmzellen entgegenwirken können (40,41).

Die wichtigste Funktion der IEL scheint demnach in einer immunologischen Überwachung der Darmschleimhaut zu bestehen, wahrscheinlich mit dem Ziel sowohl eine überschießende Immunantwort zu kontrollieren, als auch notwendige Abwehrmaßnahmen gegenüber Tumoren und Mikroorganismen zu initiieren bzw. auszuführen.

1.2 IEL NACH DÜNNDARMTRANSPLANTATION

Untersuchungen über intraepitheliale Lymphozyten nach Dünndarmtransplantation befassen sich vornehmlich mit dem Thema der akuten Transplantatabstoßung und analysieren dabei vor allem phänotypische Veränderungen der Lymphozyten (42-44). Hintergrund der Untersuchungen sind die Schwierigkeiten, die bei der Diagnose einer akuten Abstoßung nach Dünndarmtransplantation auftreten

können. So trifft der Grundsatz, daß eine Infiltration des transplantierten Organs durch Lymphozyten des Empfängers ein histologisches Kennzeichen einer akuten Abstoßung ist, bei der Dünndarmtransplantation nur begrenzt zu (45). Die lymphozytäre Infiltration des Transplantats zeigt nach Dünndarmtransplantation nicht sicher eine akute Abstoßungsreaktion an, sondern kann lediglich Folge der physiologischen Migration von Lymphozyten im Gastrointestinaltrakt sein (2,20,46). Diese physiologische lymphozytäre Migration führt auch ohne Abstoßung zur zunehmenden Verdrängung der Spenderlymphozyten in der Lamina propria, den Peyerschen Plaques sowie den regionalen Lymphknoten durch Lymphozyten des Empfängers. Daher erscheint der Nachweis von Empfängerlymphozyten in diesen Teilen des Darmes zur Abstoßungsdiagnostik nur wenig geeignet.

Basierend auf der Hypothese, daß IEL an der physiologischen lymphozytären Migration nicht teilnehmen (6), wurde von einigen Autoren die Infiltration des intraepithelialen Kompartiments mit Empfängerlymphozyten als sicheres Zeichen einer akuten Abstoßung gewertet (42). Da inzwischen aber zumindest für die thymusabhängig gereiften IEL ein Migrationsverhalten ähnlich dem anderer Lymphozyten des GALT als wahrscheinlich gilt, ist diese Hypothese kritisch zu diskutieren (11,20). So bleibt die Bedeutung der Infiltration der Mukosa mit Empfängerlymphozyten im Rahmen der akuten Abstoßung ungeklärt, wenngleich der Nachweis spenderspezifischer zytotoxischer Lymphozyten im Darm nach Dünndarmtransplantation auf eine Beteiligung der infiltrierenden Zellen bei der Gewebeerstörung bei akuter Abstoßung hinweist (47).

1.3 IEL BEI GRAFT-VERSUS-HOST-REAKTION

Das komplementäre Gegenstück zur akuten Abstoßungsreaktion (Host-versus-Graft-Reaktion) ist die Graft-versus-Host-Reaktion (GvHR), die als immunologische Reaktion immunkompetenter transplantierte Zellen gegen den Empfängerorganismus definiert ist (48). Voraussetzung für die Entwicklung einer GvHR ist die Transplantation immunkompetenter Zellen, die sich genetisch vom Empfänger unterscheiden. Gleichzeitig muß der Empfängerorganismus unfähig sein, auf die transplantierten Zellen adäquat zu reagieren, bzw. diese zu

beseitigen (48,49).

Häufigste Ursache dieser Unfähigkeit ist die medikamentös induzierte Immunsuppression des Empfängers z.B. nach Knochenmarktransplantation. Im Tiermodell läßt sich dieses Fehlen einer Immunantwort des Empfängers durch die Transplantation elterlicher Zellen in einen F1-Nachkommen induzieren. Da F1-Nachkommen elterliche Zellen nicht als fremd erkennen können, unterbleibt die Immunantwort (50,51). Die transplantierten elterlichen Zellen hingegen lösen eine GvHR im Empfänger aus, die je nach Stammkombination der Spender- und Empfängertiere und in Abhängigkeit von der transplantierten Zellpopulation verschiedenster Ausprägung sein kann. Vorteil dieses parent-into-F1-Modells ist die Ausbildung einer reinen GvHR ohne Abstoßungsreaktion. Außerdem müssen die Empfänger bei diesem Modell nicht wie bei klinischer Knochenmarktransplantation üblich, bestrahlt oder chemotherapeutisch vorbehandelt werden, wodurch die Beurteilung der durch GvHR induzierten Veränderungen erschwert würde (52).

Zu den am schwersten in Mitleidenschaft gezogenen Organen bei akuter GvHR gehören neben Leber und Haut insbesondere der Gastrointestinaltrakt (53-55). Histologisch finden sich hier neben Epithelzellnekrosen, Kryptenhyperplasie und einem submukösem Ödem insbesondere eine Infiltration der Lamina propria und der Mukosa mit Spenderlymphozyten (53,56). Dabei zeigt sich bei der phänotypischen Analyse der infiltrierenden Lymphozyten im Gastrointestinaltrakt sowohl bei Patienten mit GvHR, als auch in verschiedenen Tiermodellen akuter GvHR regelmäßig ein Übergewicht an $CD8^+$ T-Zellen. Die infiltrierenden Zellen im Darm weisen damit einen Phänotyp ähnlich der IEL auf, unterscheiden sich aber von den infiltrierenden Zellen in anderen von GvHR in Mitleidenschaft gezogenen Organen. Dort kann es je nach Disparität zwischen Spender und Empfänger (MHC II oder I) entweder zur verstärkten Proliferation der $CD4^+$ oder $CD8^+$ Spenderlymphozyten kommen.

Die Ursache der phänotypischen Selektion der infiltrierenden Lymphozyten im Darm ist noch wenig verstanden. Eine wichtige Rolle bei dieser selektiven T-Zell Migration spielt vermutlich die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle, die entscheidenden Einfluß auf die Lymphozytenmigration im Gastrointestinaltrakt

haben können (57).

Ungewiß ist auch die Bedeutung der lymphozytären Infiltration der Mukosa für das Ausmaß und den Verlauf der Erkrankung. So wird der Aktivierung der infiltrierenden Zellen durch Empfängerantigene eine wichtige Rolle bei der Induktion des Gewebeschadens zugeschrieben und der Nachweis einer spezifischen zytolytischen anti-Host Aktivität der Spender T-Zellen in den Zielorganen akuter GvHR unterstützt diese Hypothese (53). Andererseits korreliert das Ausmaß der Gewebeerstörung in den betroffenen Organen nicht immer mit dem Ausmaß der lymphozytären Infiltration (54,55,58), so daß die genauen Mechanismen der Gewebeerstörung bei dieser Erkrankung als noch nicht ausreichend definiert gelten müssen.

1.4 IEL BEI SEPSIS

Infektionen zählen zu den häufigsten Erkrankungen, die den Gastrointestinaltrakt betreffen können. Die klinisch schwersten Manifestationen bakterieller, meist gram-negativer Infektionen sind Sepsis oder SIRS (systemic inflammatory response syndrome) und ein evtl. daraus resultierendes Multiorganversagen, wenngleich die Entwicklung von Sepsis und SIRS nicht zwingend an eine vorausgehende Infektion gebunden ist (59). Als auslösendes Agens gram-negativer Sepsis werden Lipopolysaccharide (LPS) der bakteriellen Zellwand angesehen, deren intravenöse Gabe sowohl beim Menschen als auch bei Tieren ein dem septischen Schock ähnliches Krankheitsbild mit Fieber, Hypotonie und inadäquater Organperfusion auslösen kann. Ursächlich scheint dabei die Freisetzung zahlreicher Zytokine, allen voran $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 zu sein (60,61)

Ausgangspunkt dieser bakteriellen Infektionen ist oft der Gastrointestinaltrakt mit seinem fast unerschöpflicher Reservoir potentiell pathogener Keime. In der Regel wird die Invasion von Mikroorganismen aus dem Darmlumen durch ein komplexes Barriersystem verhindert, zu dem neben zahlreichen unspezifischen Mechanismen wie Schleimproduktion, rascher Epithelerneuerung, Peristaltik und mukosaler IgA Sekretion auch die Lymphozyten des GALT, allen voran die IEL, beitragen (2,10,62-64).

Eine Herabsetzung dieser mukosalen Schutzfunktionen kann die Entwicklung von Infektionen begünstigen. So kommt es nach Verbrennungen oder Polytrauma zu einer Herabsetzung der mukosalen Barrierefunktion (65). Interessanterweise kann die Translokation von Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt aber auch durch Endotoxinämie verstärkt werden (66). Damit wären die Voraussetzungen für den Teufelskreis einer sich selbst unterhaltenden Infektion gegeben. Da dies in der Regel aber nicht eintritt, sondern der Körper in der Lage ist, Krankheitserreger zu eliminieren, muß es nach Endotoxinämie neben einer Herabsetzung der Barrierefunktion gleichzeitig zu einer Aktivierung von Abwehrmechanismen kommen. Auch hier könnten IEL die Protagonisten einer solchen aktivierten Abwehr sein (67). Die Berichte über phänotypische Veränderungen intestinaler Lymphozyten nach Sepsis, die eine Aktivierung dieser Lymphozyten widerspiegeln könnten, widersprechen sich jedoch (26,68) und über die funktionellen Veränderungen der IEL nach Endotoxinämie ist bislang nur wenig bekannt.

1.5 IEL BEI MORBUS CROHN

Morbus Crohn, eine der Manifestationen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beim Menschen, ist durch chronisch rezidivierende, nicht-infektiöse transmurale Entzündungen des Gastrointestinaltraktes charakterisiert (69-71). Während die klinischen und histopathologischen Merkmale des Morbus Crohn umfassend charakterisiert wurden, bleibt die Ätiologie dieser Erkrankung unklar. Eine der Hypothesen zur Pathogenese des Morbus Crohn beruht auf der Dysfunktion des intestinalen Immunsystems und einer daraus resultierenden inadäquaten und überschießenden Immunantwort. In der Folge kann sich eine Kreuzreaktion gegenüber bakteriellen Antigenen und Epithelzellen entwickeln, die schwere Entzündungen und Zerstörung der Darmschleimhaut induziert und unterhält (71,72).

Unterstützt wird dieses Konzept eines gestörten immunologischen Gleichgewichts im Gastrointestinaltrakt bei Morbus Crohn durch die Beobachtung, daß sog. TCR-knock-out Mäuse, die erhebliche Veränderungen verschiedener T-Zell Populationen aufweisen, auch entzündliche Veränderungen im

Gastrointestinaltrakt entwickeln, die wiederum den Veränderungen von Patienten mit Morbus Crohn entsprechen (73-75). Desweiteren zeigte sich, daß die Behandlung mit Immunosuppressiva, die die T-Zell Funktion beeinflussen, wie z.B. Cyclosporine, den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann (76). Schließlich konnte bei einigen Patienten mit schwerem Morbus Crohn durch allogene Knochenmarktransplantation eine langfristige Remission erreicht werden (77).

Wenngleich diese Ergebnisse die Hypothese einer abnormen lymphozytären Aktivierung bei Morbus Crohn unterstützen, so herrscht doch Unklarheit über die beteiligten Lymphozytenpopulationen und die auslösenden Momente dieser Aktivierung. Die Beobachtung, daß sich ein Rezidiv der Erkrankung durch Ingestion von Darminhalt auslösen läßt, deutet erneut auf luminale Antigene als entscheidende Faktoren bei der Entwicklung entzündlicher Darmerkrankungen (78). Die ersten Lymphozyten, die durch derartige luminale Antigene aktiviert werden könnten, sind die intraepithelialen Lymphozyten. Auf eine mögliche Beteiligung dieser Zellen am Krankheitsprozeß weist auch die vermehrte Proliferation und Zytokinproduktion intraepithelialer Lymphozytenzelllinien von Patienten mit Morbus Crohn hin (79). Ein weiterer Hinweis auf eine selektive T-Zell Aktivierung im Gastrointestinaltrakt ist der Nachweis erhöhter Konzentrationen von IL-2 mRNA im Darm, nicht aber im peripheren Blut bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung (80). Vor diesem Hintergrund erscheint eine vergleichende Untersuchung zwischen Phänotyp und Funktion peripherer Blutlymphozyten einerseits und IEL andererseits bei Patienten mit Morbus Crohn sinnvoll.

1.6 INTESTINALE ISCHÄMIE-REPERFUSION

Ein weiteres Modell der intestinalen Schädigung beruht auf der Unterbrechung der Blutversorgung des Gastrointestinaltraktes. Zahlreiche chirurgische Erkrankungen wie z.B. Volvulus oder Mesenterialinfarkt, sind durch eine solche Ischämie und die ggf. nachfolgende Reperfusion charakterisiert (81,82).

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen intestinalen Erkrankungen beruht das Modell der Ischämie/Reperfusion (I/R) weder auf einer Reaktion gegenüber Fremdanitgenen (wie bei Transplantation oder GvHR), bakteriellen Antigenen (wie

bei Sepsis) oder einer Dysregulation des gastrointestinalen Immunsystems (wie z.B. M. Crohn). Durch dieses zumindest initiale Fehlen einer immunologischen Komponente eignet sich dieses Modell insbesondere zur Erforschung der nicht-immunologischen Mechanismen der Schädigung der intestinalen Integrität. Die Mechanismen dieser Schädigung und mögliche protektive Faktoren standen daher im Mittelpunkt der Untersuchungen bei intestinaler Ischämie/Reperfusion.

Bedeutsam ist im Rahmen der Ischämie/Reperfusion weniger die Ischämie, als vielmehr die mit der nachfolgenden Reperfusion des ischämischen Organabschnittes auftretende Gewebeschädigung. Hinzu kommt, daß sich dieser sog. Ischämie/Reperfusionsschaden (I/RS) nicht auf den ischämischen Darmabschnitt beschränkt, sondern auch zu pathophysiologischen Veränderungen an anatomisch entfernten, zuvor nicht ischämischen Organen führt (83-85). Eine Erklärung für diese bislang wenig verstandene Dissemination des I/RS basiert u.a. auf der Vorstellung, daß toxische Substanzen, wie z.B. Sauer- und Stickstoffintermediate aus dem betroffenen Organ nach Reperfusion mit dem Blutstrom im Organismus verteilt werden und dann auch in entfernten Organen zur Gewebeschädigung führen (85-87). Diese Hypothese könnte auch die bevorzugte Beteiligung von Lunge oder Leber im I/RS erklären, da beide Organe große Mengen venösen Blutes aus dem Organismus erhalten (83,85).

Neben diesem „wash-out“ Phänomen trägt nach intestinaler I/R sicherlich auch der Zusammenbruch der intestinalen Barrierefunktion und die daraus resultierende Bakteriämie zur Dissemination des I/RS bei (88,89). Das ganze Ausmaß der Gewebeschädigung nach I/R zeigt sich meist erst nach der Reperfusion des betroffenen Organs. Dennoch kommt es schon während der Ischämie zur Beeinträchtigung der Gewebeintegrität, die mit steigender Dauer der Ischämie zunimmt (81,90). So läßt sich im Darm bereits während der Ischämiephase eine Schädigung der Mukosa und Lamina propria mit Einschränkung der mukosalen Barrierefunktion beobachten (81,83,90).

Die Wiederherstellung der mesenterialen Durchblutung führt durch Desquamation des Epithels zu einer weiteren Zerstörung der Darmschleimhaut (83). Ursächlich beteiligt an dieser direkt nach Reperfusion auftretenden Gewebeschädigung scheinen Sauerstoffradikale (ROI) zu sein (83,91-93). Die hochreaktiven Radikale

und Intermediate können durch direkte Reaktion mit Lipiden und Proteinen der Zellmembranen den Gewebeschaden induzieren, oder indirekt durch Vasokonstriktion und Thrombozytenaktivierung zu Mikrozirkulationsstörungen beitragen, oder aber durch Aktivierung von Leukozyten zur Ausdehnung der Inflammation führen (94-97).

Diese Aktivierung von Leukozyten, bzw. polymorphnukleären Neutrophilen (PMN) ist wiederum das Kennzeichen der späteren Phase der Gewebeschädigung (83,87). Dabei unterliegt die Aktivierung der PMN einer Signalkaskade, an deren Ende u.a. die Expression von Adhäsionsmolekülen am Gefäßendothel steht (95). Sauerstoffradikale aus aktivierten Leukozyten/PMNs sind aber nicht nur maßgeblich an der Gewebeerstörung während der Reperfusionsphase in den ehemals ischämischen Organabschnitten beteiligt, sondern scheinen auch eine entscheidende Rolle bei der Dissemination des I/R-S zu spielen, wenngleich die exakten Mechanismen noch ungeklärt sind (83,84,87).

Aufgrund dieser deletären Wirkung der inflammatorischen Reaktion im Rahmen des I/RS, schien die Unterdrückung dieser Reaktion z.B. durch Gabe anti-inflammatorischer Zytokine ein geeignetes Mittel zur Behandlung oder Prophylaxe des I/RS zu sein (98). Im Widerspruch zu dieser protektiven Wirkung anti-inflammatorischer Zytokine auf den I/RS steht allerdings die Beobachtung, daß endogene Schutzmechanismen, die zur Überwindung des I/RS notwendig sein können, möglicherweise erst durch die inflammatorische Antwort in Gang gesetzt werden.

Zu diesen Schutzmechanismen zählt u.a. die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare NO-Synthase (NOS-2), wie es im besonderen für Leber und Darm gezeigt werden konnte (99-101). Obgleich die vermehrte Produktion von NO auch zu negativen Effekten führen kann - die mitunter therapierefraktäre Hypotension bei septischen Patienten beruht auf einer gesteigerten NO-Produktion (102)- deuten die positive Wirkungen von NO auf die Mikrozirkulation, die Neutralisation von Sauerstoffradikalen, die Hemmung der Leukozyteninfiltration und nicht zuletzt seine Rolle bei der mukosalen Barrierefunktion (durch zytotoxische Wirkung auf Pathogene) insgesamt auf eine protektive Rolle von NO im I/RS hin (99-101).

Schutzwirkung insbesondere vor Radikalen bieten auch die intrazellulären Antioxidationsysteme, wie z.B. Vitamin C, E, oder das Glutathionsystem. Die protektive Wirkung des Tripeptids Glutathion beruht auf seiner Fähigkeit als Protonendonator Radikale abzubauen und so intrazelluläre Proteine und Lipide vor der Oxidation zu schützen und das intrazelluläre Redoxgleichgewicht zu erhalten (103-105). Durch die Reaktion mit Radikalen wird Glutathion dabei aus der Tripeptidform (GSH) in die Disulfidform (GSSG) überführt. Der Abfall der intrazellulären GSH-Konzentration kann somit als Maß für den oxidativen Streß, bzw. die antioxidative Kapazität der Zelle dienen (103,105). Da aber nicht nur oxidativer Stress, sondern auch die Hemmung der GSH-Synthese, bzw. die Hemmung des GSH-Recyclings durch Hemmung der GSH-Reduktase zu einer Herabsetzung der intrazellulären GSH-Konzentration führen kann, ist die Korrelation von GSH-Konzentration und oxidativem Streß nur bedingt zulässig (106).

Protektiv wirken möglicherweise aber auch andere Streßproteine wie z.B. die induzierbare Isoform der Hämoxygenase-1 (HO-1 oder HSP32), ein Enzym, dem eine ausgeprägte anti-inflammatorische Kapazität nachgesagt wird (85,107-109). HO-1 katalysiert die Umwandlung des toxischen Häm zu Biliverdin und Bilirubin, freiem Eisen und Kohlenmonoxid (110). Die protektive und antiinflammatorische Wirkung von HO-1 wird weniger durch das Enzym direkt, als vielmehr durch die Produkte der katalysierten Reaktion vermittelt. Biliverdin und Bilirubin sind potente Antioxidantien, Kohlenmonoxid wiederum bewirkt eine Vasodilatation und eine damit verbundene Verbesserung der Mikrozirkulation sowie eine Hemmung der Leukozytenadherenz (111,112). Bedeutsam scheint in diesem Zusammenhang auch die mögliche Induktion der HO-1 durch NO zu sein (113).

Das Ausmaß und die Dissemination des Gewebeschadens nach intestinaler I/R, sowie die Bedeutung der endogenen potentiell protektiven Systeme GSH, NOS-2 und HO-1 während intestinaler I/R, sowie mögliche therapeutische Ansätze zur Minderung des I/RS standen im Mittelpunkt des zweiten Teils dieser Arbeit.

2 FRAGESTELLUNG

Seit über 10 Jahren ist bekannt, daß intraepitheliale Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der immunologischen Überwachung der Darmschleimhaut spielen.

Lange fehlten jedoch Daten über die Funktion und den Phänotyp dieser Zellen bei verschiedenen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes. Da die Überwachungsfunktion der IEL insbesondere nach Organtransplantation, bei der Infektionsabwehr sowie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine entscheidende Rolle einnimmt, wurde versucht, IEL bei diesen Erkrankungen, bzw. in entsprechenden Tiermodellen zu charakterisieren. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen neben der Analyse des Phänotyps die zytolytischen Fähigkeiten dieser Zellen.

Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich, daß es bei gastrointestinalen Erkrankungen, die mit einer Schädigung der intestinalen Integrität einhergehen, neben einer Aktivierung des Immunsystems auch zu einer verstärkten Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (NOS-2) im Darm kommt. Wenngleich die Bedeutung dieser verstärkten NOS-2 Expression noch unklar ist, deutet sie doch auf oxidativen Streß als einen pathophysiologischen Faktor bei der Schädigung der intestinalen Integrität hin.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher versucht, oxidativen Streß bei intestinaler Schädigung zu analysieren und mögliche protektive Faktoren, die den Gewebeschaden verringern, zu identifizieren. Um den Einfluß allogener, bakterieller oder viraler Antigene auf die Gewebeschädigung gering zu halten, wurden die Untersuchungen in einem intestinalen Ischämie/Reperusionsmodell durchgeführt. In diesem klinisch relevanten Modell wurde neben der Freisetzung von Sauerstoff- und Stickstoffintermediaten sowie der Expression potentiell antioxidativ wirkender Systeme, die Beeinflussung des Gewebeschadens durch die Gabe von pro-und anti-inflammatorischen Zytokinen analysiert.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 PATIENTEN

Dünndarmschleimhaut wurde aus dem Operationsmaterial von sechs Patienten mit Morbus Crohn gewonnen. Die Gewebeproben (Jejunum oder terminales Ileum) wurden jeweils von dem makroskopisch am wenigsten entzündlich veränderten Schleimhautareal entnommen.

In allen Fällen wurde die Diagnose des Morbus Crohn durch die histopathologische Untersuchung des resezierten Darmabschnittes bestätigt. Zum Zeitpunkt der elektiven Operation wurde keiner der Patienten mit systemischen Steroiden oder Immunsuppressiva behandelt.

Als Kontrollpatienten dienten sechs Patienten, die nicht an einer entzündlichen Darmerkrankung litten. Bei zwei dieser Patienten wurde eine Operation nach Kausch-Whipple aufgrund eines Pankreaskopfkarzinoms, bzw. einer chronischen Pankreatitis durchgeführt. Eine Patientin erhielt eine biliodigestive Anastomose wegen Gallengangstenose nach laparoskopischer Cholecystektomie. Ein Patient unterzog sich einer Magenresektion nach Billroth-II wegen rezidivierender Ulzera. Bei diesen Patienten wurden die Dünndarmschleimhautproben aus dem Jejunum bei Roux-Y-Rekonstruktion des Gastrointestinaltraktes gewonnen. Eine Gewebeprobe stammt aus dem terminalen Ileum eines Patienten, der sich einer Darmresektion aufgrund rezidivierender intestinaler Blutungen bei Angiodysplasien im terminalen Ileum und Zökum unterzog.

Alle Patienten hatten der Gewebeentnahme aus dem Operationsmaterial zugestimmt.

3.2 TIERE

Als Versuchstiere dienten 10-12 Wochen alte weibliche C57BL/6J (H-2^b), DBA/2J (H-2^d) und C57BL/6J x DBA/2J F1 (H-2^{b,d}) Mäuse (The Jackson Laboratories, Bar Harbor USA), sowie männliche ACI (RT-1^a) und Lewis (RT-1^l) Ratten (Harlan Winkelmann, Deutschland) mit einem Körpergewicht von ca. 200-300 g. Die Tiere wurden in einem 12h/12h Tag/Nacht-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang

zu Wasser und Standardfutter. Das Akklimatisierungsintervall zwischen Eintreffen der Tiere und Versuchsbeginn betrug mind. eine Woche.

3.3 KRANKHEITSMODELLE

3.3.1 DÜNNDARMTRANSPLANTATION

Orthotope Dünndarmtransplantation wurde in Ratten sowohl in der allogenen Stammkombination ACI-Spender auf Lewis-Empfänger, als auch in der syngenesischen Kombination ACI-Spender auf ACI-Empfänger durchgeführt.

Die Transplantationen wurden in Standardtechnik durchgeführt (114). Dazu wurden die Tiere unter Vollnarkose mit Methoxyfluoran-Inhalation (Pittman Moore Inc., Mundelein, IL, USA) und 25 mg/kg Pentobarbital intraperitoneal (Abbott, Chicago, IL, USA) median laparotomiert. Zunächst wurde der Darm des Spendertieres vom Treitz'schen Band bis zur Ileozökalklappe dargestellt. Nach Perfusion und intraluminärer Spülung wurde der Darm mit einem Gefäßstiel, bestehend aus der Pfortader und der A. mesenterica superior mit Aortenpatch, entnommen. Dem Empfängertier wurde vor der Implantation des Spenderorgans der eigene Dünndarm komplett entfernt. Bei der Implantation des Spenderorgans wurden die Pfortader und die A. mes. sup. des Transplantates End-zu-Seit mit der Vena cava inferior, bzw. der infrarenalen Aorta anastomosiert. Proximal und distal wurde der Darm End-zu-End mit dem Empfängerdarm anastomosiert, so daß das Transplantat funktionell in den Gastrointestinaltrakt des Empfängertieres integriert wurde.

Die postoperative Immunsuppression bestand aus Tacrolimus in einer täglichen Dosis von 2 mg/kg. Diese Dosis verhindert in der vollallogenen Stammkombination ACI-in-Lewis zuverlässig eine akute Abstoßung des Transplantats (115,116).

3.3.2 Akute Graft-versus-Host-Reaktion

Als Modell einer akuten nicht-letalen Graft-versus-Host-Reaktion (GvHR) wurde ein murines "parent-into-F1-Modell" verwendet, in dem nicht bestrahlte C57BL/6J

x DBA/2J F1 Mäuse zur Induktion der GvHR jeweils 5×10^7 elterliche C57BL/6J Milzzellen als intravenöse Injektion über eine Schwanzvene erhielten. Es ist mehrfach gezeigt worden (117,118), daß in dieser Stammkombination die Inokulation von 5×10^7 elterlichen Zellen regelmäßig zu einer akuten nicht-letalen GvHR im Empfängertier führt.

Als Kontrolltiere dienten gleichaltrige C57BL/6J und unbehandelte C57BL/6J x DBA/2J F1 Mäuse. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere mittels CO₂-Intoxikation getötet. Dünndarm und Milz wurden sofort zur Lymphozytenisolierung entnommen.

3.3.3 Sepsis

Weibliche C57BL/6J Mäuse erhielten zur Sepsisinduktion jeweils 2,5 mg/kg LPS (*E.coli* 0111:B4, Sigma, USA) in 1 ml Kochsalzlösung als intravenöse Injektion in eine Schwanzvene. Kontrolltieren wurde 1ml isotone Kochsalzlösung injiziert. 1h, 3h, 6h, 12h und 48h nach Sepsisinduktion wurden die Tiere getötet und Gewebeproben zur weiteren Analyse entnommen.

Die Gabe von 2,5 mg/kg LPS führt bei den Mäusen zu einem nicht-letalen septischen Krankheitsbild, das mit Fieber, Zytokinfreisetzung und Gewichtsabnahme einhergeht (119).

3.3.4 Intestinale Ischämie/Reperfusion

Männliche Lewis Ratten wurden unter Vollnarkose (Ketanest (100 mg/kg) / Xylacin (5 mg/kg), Äther-Inhalation) median laparotomiert. Nach Präparation der Arteria mesenterica superior (SMA) unter Schonung der Pfortader und der A. hepatica wurde der Blutfluß in der SMA selektiv aortennah mit einer Yasagil-Klemme unterbrochen. Das sofortige Abblassen des gesamten Dünndarms, sowie die Pulslosigkeit des Mesenteriums bei gleichzeitig unveränderter Perfusion der Leber diente der Kontrolle der richtigen Platzierung der Klemme. Die Ischämiedauer betrug bei allen Tieren 60 min. Fünf Minuten vor Ende der Ischämiephase wurde den Tieren entweder Interleukin-2 (40 µg/kg), Interleukin-10 (40µg/kg) oder isotone Kochsalzlösung (jeweils 1ml) intravenös in eine Penisvene injiziert. Nach

Abschluß der Ischämiephase wurde die Klemme entfernt und das Abdomen verschlossen.

Je nach Dauer der Reperfusionphase wurden die Tiere noch während der Narkose durch aortalen Blutentzug in Narkose getötet (Reperfusionphase <1h) oder bis zum Aufwachen aus der Narkose überwacht (Reperfusionphase >1h). Bei Reperfusionphasen >1h wurden die Tiere nach Ende der Reperfusionphase in erneuter tiefer Vollnarkose ebenfalls durch aortalen Blutentzug getötet. Neben den Blutproben wurden Gewebeproben aus dem Dünndarm (jeweils mittleres Jejunum und Ileum) und aus beiden Leberlappen für die nachfolgenden Untersuchungen entnommen.

Versuchsgruppen:

- **Kontrolle:** Die Tiere wurden nur laparotomiert und nach einer Narkosedauer von einer Stunde getötet.
- **Ischämie:** Die Tiere wurden einer intestinalen Ischämie von 1h unterworfen und am Ende der Ischämiephase getötet.
- **I/RS (1,4,24):** Die Tiere wurden einer intestinalen Ischämie von 1h unterworfen und nach einer Reperfusionphase von 1h, 4h oder 24h getötet.
- **IL-2 (1,4,24):** Die Tiere wurden einer intestinalen Ischämie von 1h unterworfen und erhielten vor Reperfusion 40 µg IL-2/kg i.v.. Die Tiere wurden nach einer Reperfusionphase von 1h, 4h oder 24h getötet.
- **IL-10 (1,4,24):** Die Tiere wurden einer intestinalen Ischämie von 1h unterworfen und erhielten vor Reperfusion 40 µg IL-10/kg i.v.. Die Tiere wurden nach einer Reperfusionphase von 1h, 4h oder 24h getötet.

3.4 ZELLISOLIERUNG

3.4.1 Intraepitheliale Lymphozyten

Die Isolierung humaner und tierischer IEL erfolgte mittels einer modifizierten, von Taguchi et al. (9). beschriebenen Methode.

Durchführung:

Der Dünndarm einer Ratte oder Maus wurde mit kaltem RPMI 1640 (Bio-Whittaker, Walkersville, USA, supplementiert mit 1 mM Natriumpyruvat, 0,1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol und 2% hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS)) von Stuhl freigespült. Nachdem das Mesenterium entfernt und alle sichtbaren Peyerschen Plaques exzidiert wurden, wurde der Darm längs eröffnet und in ca. 1 cm große Stücke geschnitten.

Zur Isolierung humaner IEL aus Operationsmaterial wurde zunächst die Mukosa von der Submukosa und Muscularis des Präparats scharf abpräpariert. Die Mukosa wurde dann ebenfalls in RPMI 1640 gewaschen und in ca. 1x1 cm große Stücke geschnitten.

Die humanen oder tierischen Gewebestücke wurden dann zweimal in frischem RPMI 1640 gewaschen und in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit auf 37°C erwärmten PBS (Phosphate-buffered-saline, ohne Calcium oder Magnesium, supplementiert mit 10% FCS und 0,1 mM Dithioerythrit) versetzt und 30 min. bei 37°C kräftig gerührt.

Nach dem Rührvorgang ließ man die Darmstücke sedimentieren und dekantierte und sammelte den Überstand, der u.a. Epithelzellen und IEL enthält. Der Rührvorgang wurde mit frischem PBS wiederholt. Bei der Isolierung humaner IEL wird der Rührvorgang dreimal durchgeführt.

Zur Entfernung von größeren Gewebestücken und Detritus wurde der gesammelte Überstand über Nylonwollensäulen gereinigt. Die Trennung der IEL von den Epithelzellen erfolgte danach mittels diskontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation. Die Zellen wurden dazu in 44%iger Percoll-Lösung (44% isotones Percoll, 56% RPMI ohne FCS) resuspendiert und mit 67% Percoll-Lösung (67% isotones Percoll, 33% RPMI ohne FCS) unterschichtet. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur für 20 Minuten bei 600 g wird die Interphase mit den IEL abpipettiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit RPMI gewaschen, in Kulturmedium resuspendiert und gezählt.

3.4.2 Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten

Lymphozyten wurden bei Mäusen aus der Milz und bei Ratten aus der Milz, sowie mesenterialen und zervikalen Lymphknoten gewonnen.

Durchführung:

Milz oder Lymphknoten werden in einer Petrischale mit Medium (RPMI ohne FCS) mit einem Glasschliffstopfen zerdrückt. Die so gewonnene Zellsuspension wird mehrfach in Medium resuspendiert und dann durch ein Nylonnetz gefiltert. Die Zellsuspension wird einmal gewaschen und dann zur Lyse der darin enthaltenen Erythrozyten in $\text{TrisNH}_4\text{HCL}$ resuspendiert und für ca. 10 min. inkubiert. Nach der Inkubation wird die Zellsuspension dreimal gewaschen, in Kulturmedium resuspendiert und gezählt.

3.4.3 Humane periphere Blutlymphozyten

Periphere Blutlymphozyten wurden aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll isoliert.

Durchführung:

Die heparinisierten Vollblutproben werden 1:2 mit PBS verdünnt und durchmischt. In 15 ml Falcon Röhrchen wird jeweils 3 ml Ficoll mit 9 ml der Blut/PBS-Mischung überschichtet und bei Raumtemperatur für 30 min. bei 900 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation reichern sich die Lymphozyten in der Interphase an. Nach Abpipettieren der Interphase wird die Lymphozytensuspension zweimal in HBSS gewaschen, in Kulturmedium resuspendiert und gezählt.

3.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Das Prinzip der Durchflußzytometrie beruht auf der Analyse von Fluoreszenz- und Lichtstreuemarken von Partikeln (Zellen), die in einer Suspension einzeln an einem Lichtstrahl vorbeigeführt werden. Idealerweise wird die zu untersuchende Zellsuspension in einem Flüssigkeitsmantel so an der Lichtquelle vorbeigeführt, daß jedes Partikel, bzw. jede Zelle einzeln wie in einer Perlenkette aufgereiht

hintereinander dem Lichtstrahl ausgesetzt wird (hydrodynamische Fokussierung). Dabei wird jedes Partikel als Event (Ereignis) vom Gerät erfaßt (120).

Das im Kreuzungspunkt zwischen dem Lichtstrahl und der Zelle entstehende Streulicht wird in verschiedenen Raumwinkeln ausgewertet und kann verschiedene Eigenschaften der Zelle wiedergeben. Die Streuung des Lichts im Engwinkel („forward scatter“ FSC) gibt Aufschluß über die Zellgröße, während die Streuung des Lichts im rechten Winkel (side scatter SSC) die Zellgranularität bestimmt. Entsprechend der FSC und SSC Charakteristika kann eine Population innerhalb der zu untersuchenden Zellsuspension für weitere Untersuchungen ausgewählt werden.

Nach Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern kann dann in der ausgewählten Population durch Fluoreszenzmessung die Verteilung und Dichte der zu untersuchenden Oberflächenantigene ermittelt werden. Dabei ist auf eine Korrektur (compensation) der sich überlappenden Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zu achten (120).

Durchführung:

Die Markierung der Zellen erfolgte bei 4°C. Die Zellen werden in FACS Medium (Hank's balanced salt solution, 0,1% bovines Serumalbumin, 0,1% Natriumazid) resuspendiert und in Aliquots à 1×10^6 Zellen eingesetzt. Bei Verwendung muriner Zellen werden diese zunächst 10 min. mit einem unmarkiertem anti-FcR Antikörper vorinkubiert, um Fc-Rezeptoren zu blockieren. Zur Analyse humaner peripherer Blutlymphozyten wurden heparinisierte Vollblutproben verwendet, in denen nach Antikörpermarkierung die Erythrozyten lysiert wurden.

Für Zweifarben- und Dreifarben-Durchflußzytometrie werden die Zellen mit FITC-, PE- oder Cy-chrome-markierten Antikörpern für 30 min. im Dunkeln inkubiert und danach zweimal in FACS Medium gewaschen. Bei der Verwendung von Biotin-markierten Antikörpern, werden die Zellen zunächst mit FITC-AK inkubiert und danach zweimal mit FACS Medium gewaschen. Anschließend werden sie mit den entsprechenden biotinylierten AK markiert, zweimal gewaschen und in einem weiteren Schritt mit Streptavidin-PE (Southern Biotechnology Ass., Birmingham, AL, USA) für 10 min. inkubiert und schließlich nochmals gewaschen. Alle Zellen werden in 1% Paraformaldehydlösung fixiert und in einem FACScan (Becton

Dickinson & Co., Mountain View, CA) analysiert.

30.000 Ereignisse wurden im Analysenfeld für Zweifar- und Dreifar- Durchflußzytometrie gezählt. Das Analysenfeld wurde entsprechend der für Lymphozyten typischen Charakteristika im FSC und SSC ausgewählt und schließt Zelldebris, tote Zellen und Epithelzellen entsprechend ihrer Größe und Granularität von der Analyse aus. Die prozentualen Angaben der verschiedenen Lymphozytenpopulationen basieren ausschließlich auf den Zellen im Analysenfeld. Die Rohdaten wurden mit Hilfe eines Computerprogramms (LYSIS II oder CellQuest Software von Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA, USA) analysiert und graphisch dargestellt.

3.5.1 Verwendete Antikörper

Spezies	Antigen	Fluoreszenz	Klon	Hersteller
Maus anti-Mensch	Leu-4	FITC	SK7	Becton Dickinson San Jose, CA, USA
Maus anti-Mensch	Leu-4	Biotin	SK7	Becton Dickinson
Maus anti-Mensch	Leu-4	TC	SK7	Caltag Laboratories Burlingame, CA, USA
Maus anti-Mensch	CD3	FITC	UCHT1	Pharmingen San Diego, CA USA
Maus anti-Mensch	CD4	PE	RPA-T4	Pharmingen
Maus anti-Mensch	CD8 α	PE	HIT8a	Pharmingen
Maus anti-Mensch	CD16	PE	3G8	Pharmingen
Maus anti-Mensch	CD20	PE	2H7	Pharmingen
Maus anti-Mensch	$\alpha\beta$ TCR	FITC	BMA0312	T-cell Diagnostics Woburn, MA, USA
Maus anti-Mensch	$\gamma\delta$ TCR	FITC	5A6.E91	Endogen Woburn, MA, USA
Ratte anti-Maus	Fc receptor	-	2.4G2	Pharmingen
Hamster anti-Maus	CD3 ϵ	FITC	145-2C11	Pharmingen
Ratte anti-Maus	CD4	Biotin	RM 4-5	Pharmingen
Ratte anti-Maus	CD45R/B220	FITC	Ra3-6B2	Pharmingen
Ratte anti-Maus	CD8 α	Biotin	54-6.7	Pharmingen
Ratte anti-Maus	CD8 α	TC	CT-CD8 α	Caltag Laboratories
Ratte anti-Maus	CD8 β	R-PE	53-5.8	Pharmingen
Hamster anti-Maus	$\alpha\beta$ TCR	FITC	H57-597	Pharmingen
Hamster anti-Maus	$\gamma\delta$ TCR	FITC	GL3	Pharmingen

Maus anti-Maus	H-2 ^d	FITC	SF-1.1	Pharmingen
Maus anti-Maus	H-2 ^b	Biotin	AF6-88.5	Pharmingen
Maus anti-Maus	V β 5.1,5.2	Biotin	MR9-4	Pharmingen
Ratte anti-Maus	V β 6	Biotin	RR4-7	Pharmingen
Ratte anti-Maus	V β 7	Biotin	TR310	Pharmingen
Maus anti-Maus	V β 8.1,8.2	Biotin	MR5-2	Pharmingen
Maus anti-Maus	V β 9	Biotin	MR10-2	Pharmingen
Ratte anti-Maus	V β 11	Biotin	RR3-15	Pharmingen
Ratte anti-Maus	V β 14	Biotin	14-2	Pharmingen
Maus anti-Ratte	CD3	FITC	G4.18	Pharmingen
Maus anti-Ratte	CD4	FITC	OX-35	Pharmingen
Maus anti-Ratte	CD8 α	FITC	OX-8	Pharmingen
Maus anti-Ratte	$\alpha\beta$ TCR	PE	R73	Pharmingen
Ratte anti-Ratte	RTI ^a	-	211-4D9-IE9	University of Pittsburgh
Ziege anti-Ratte	IgG	Biotin	R40015	Caltag Laboratories

3.6 BESTIMMUNG DER ZYTOLYTISCHEN AKTIVITÄT ISOLIERTER LYMPHOZYTEN

Zur Bestimmung der zytolytischen Aktivität isolierter Lymphozyten wurde ein ⁵¹Cr-Freisetzungsversuch durchgeführt. Bei diesem Experiment werden radioaktiv markierte Zielzellen mit den nicht markierten Effektorzellen (isolierten Lymphozyten) inkubiert. Die Menge der während einer festgelegten Inkubationsdauer freigesetzten Radioaktivität verhält sich proportional zur Lyse der markierten Zielzellen und ist damit ein Maß für die zytolytische Aktivität der Effektorzellen. Durch die Wahl verschiedener Zielzellen und die Zugabe von Lectinen kann sowohl die spezifische als auch die eher unspezifische „lectin-vermittelte“ zytolytische Aktivität der Effektorzellen untersucht werden (51).

Als Zielzellen dienten bei Experimenten mit humanen Lymphozyten Zellen der humanen epithelialen Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 oder Zellen der humanen Leukämiezelllinie K-562. In Experimenten mit murinen IEL werden allogene (DBA/2) Zellen der Fc-Rezeptor-positiven Mastozytomzelllinie P815 (H-2^d positiv) als Zielzellen verwendet. Zellen der syngenischen Zelllinie EL-4 (H-2^b positiv) dienen als negative Kontrolle. Zur Analyse der unspezifischen zytolytischen Aktivität wurde als Lectin 0,2 µg/ml des anti-CD3 mAk 145-2C11 verwendet.

In Experimenten mit IEL von Ratten wurden Zellen der murinen Mastozytomzelllinie P815, sowie allogene LPS-stimulierte Lymphozyten als

Zielzellen verwendet. Syngene Lymphozyten dienen als negative Kontrolle. Als Lectin wurde hier PHA (0,5 µg/ml) verwendet.

Durchführung:

Die Zielzellen werden mit [⁵¹Cr] Natriumchromat (200 µCi / 5x10⁶ Zellen) für eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach dreimal in RPMI 1640 gewaschen, um überschüssiges Chrom zu entfernen. Für jedes Experiment wurden Dreifachansätze von je 2x10³ radioaktiv markierter Zielzellen in 96-well Mikrotiterplatten mit steigender Anzahl von Effektorzellen (Effektor : Target Ratio von 1:10 bis 1:200) mit und ohne anti-CD3 mAk über 4-16 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 10 min. bei 650 g zentrifugiert und die Radioaktivität im Überstand bestimmt. Die prozentuale Zielzelllyse errechnet sich nach folgender Formel: % Zielzelllyse = [freigesetzte Radioaktivität einer Probe (cpm) - spontan freigesetzte Radioaktivität (cpm)] / [maximal freigesetzte Radioaktivität (cpm) - spontan freigesetzte Radioaktivität (cpm)] x 100%. Die spontan freigesetzte Radioaktivität aus den radioaktiv markierten Zielzellen lag bei <10% der maximal freigesetzten Radioaktivität.

3.7 BESTIMMUNG DER IFN-γ KONZENTRATION

Das Prinzip des hier verwendeten Sandwich ELISA beruht auf dem Nachweis der zu untersuchenden Substanz durch einen spezifischen an das Probengefäß gekoppelten Antikörper. Durch Bindung an diesen Antikörper werden die Antigenmoleküle an das Probengefäß fixiert. An die Ag-Ak Komplexe wird ein zweiter Antikörper angelagert, der wiederum an ein Enzym gekoppelt ist. Die Aktivität des über Ak-Antigen-Ak (Sandwich) Technik an das Probengefäß gekoppelten Enzyms wird nach Zugabe des entsprechenden Substrats photometrisch bestimmt. Mit Hilfe von Standardkurven kann dann auf die Konzentration der zu untersuchenden Substanz in der Probe geschlossen werden (121).

Durchführung:

Frisch isolierte IEL wurden in Dreifachansätzen (2x10⁶ Zellen/ml) mit jeweils 1x10⁵ bestrahlten (10 Gy) P815 Zellen in 24-well Zellkulturplatten mit immobilisiertem

anti-CD3 mAk bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Kulturüberstände abgehoben und zur IFN- γ Bestimmung eingesetzt.

ELISA Mikrotiterplatten (Dynatech, Chantilly, VA, USA) wurden mit anti-IFN- γ mAk (clone R4-6A2, Pharmingen, San Diego, CA, USA) über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Platten wurden mit PBS-Tween gewaschen und zur Vermeidung unspezifischer Bindung der gesuchten Substanz an die Mikrotiterplatten erfolgte eine Blockierung mit 3% bovinem Serumalbumin in PBS-Tween. Danach wurden die Platten wieder gewaschen und mit je 100 μ l Kulturüberstand oder IFN- γ Standardlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Platten mit einem biotinylierten anti-IFN- γ mAk (clone XMG1.2, Pharmingen, San Diego, CA, USA) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang erfolgte die Inkubation mit an Streptavidin gekoppelter alkalischer Phosphatase. Durch Zugabe des Substrats p-Nitrophenylphosphat wurde die Reaktion gestartet. Die photometrische Bestimmung der Proben erfolgte bei 405 nm. Die IFN- γ Konzentrationen der Proben wurden mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt. Für die Erstellung der Standardkurve werden Lösungen mit rekombinantem IFN- γ (Pharmingen, San Diego, CA, USA) bekannter Konzentration verwendet. Jede Bestimmung erfolgte im Dreifachansatz.

3.8 BESTIMMUNG VON ASPARTAT-AMINOTRANSFERASE UND HYALURONSÄURE

Der Anstieg der Aspartat-Aminotransferase (AST) im Serum diene als Maß für die hepatische Schädigung, während die Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration im Serum der Analyse der intestinalen Schädigung diene (122). Die Serumkonzentrationen von AST und Hyaluronsäure wurden mit handelsüblichen Reaktionskits gemessen.

3.9 BESTIMMUNG DER STICKSTOFFMONOXIDDERIVATE NITRIT UND NITRAT

Stickstoffmonoxid (NO) reagiert in Gegenwart von Sauerstoff zu den stabilen Endprodukten Nitrit, Nitrat, sowie zu S-Nitrosothiolen (123).

Die hohe Reaktivität des NO-Moleküls gepaart mit seiner kurzen Halbwertszeit,

wirkt sich negativ auf die Präzision einer direkten Messung aus (124). Die Serumkonzentration von NO wurde deshalb durch Messung der stabilen Hauptmetabolite Nitrit und Nitrat entsprechend einer modifizierten Methode nach Grieß (124) bestimmt.

Nitrit (NO_2^-) liegt in Körperflüssigkeiten hauptsächlich in oxidiert Form als Nitrat (NO_3^-) vor (125). Zur spektralphotometrischen Untersuchung muß es daher zunächst vollständig zu Nitrit reduziert werden.

Dazu werden die Serumproben nach Ultrafiltration (um Störeffekte durch Serumproteine zu minimieren) mit den Kofaktoren FAD und NADPH sowie Nitratreduktase (Boehringer Mannheim, Mannheim Deutschland) versetzt und für 45 - 60 Minuten bei 30° C inkubiert. Die Quantifizierung der Nitritkonzentration erfolgte dann mittels Grießreaktion.

Das Prinzip der Grießreaktion beruht auf der Diazotisation von Sulfanilamid (Sigma Deisenhofen, Deutschland) durch das in der Probe vorliegende Nitrit. Die nachfolgende Bindung an Naphthylethylendiamin (Merck, Darmstadt Deutschland) führt zur Rotfärbung der Probe. Die damit verbundene Extinktionsänderung ist proportional zur Nitritkonzentration in der Probe und kann bei 550 nm bestimmt werden. Zur Erstellung einer Standardkurve dienten KNO_3 - Lösungen in Konzentrationen von 0,31 bis 80 μM .

3.10 BESTIMMUNG DER GLUTATHIONGEWEBEKONZENTRATION

In einer kinetischen Reaktion kann reduziertes Glutathion (GSH) schrittweise durch DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic-acid)) zum Disulfid GSSG oxidiert werden. In Gegenwart von NADPH und Glutathion-Reduktase wird GSSG dann reduziert und kann danach erneut mit DTNB reagieren. Der Abfall der DTNB Konzentration in der Probe kann dabei photometrisch bestimmt werden. Mit Hilfe von Standardkurven kann dann die Glutathionkonzentration der Probe durch Korrelation mit dem Proteingehalt ermittelt werden. Nach Bestimmung der Gesamtkonzentration von GSH und der Konzentration des oxidierten Glutathion kann die Konzentration des reduzierten GSH wie folgt errechnet werden: reduziertes Glutathion (GSH) = Gesamt-Glutathion – oxidiertes Glutathion (GSSG) (126).

Durchführung:

Kryokonserviertes Gewebe wurde in eisgekühlter Meta-Phosphorsäure ($m\text{-H}_3\text{PO}_4$) homogenisiert und bei 3300 g und 0° C für 15 Minuten zentrifugiert. Nach Einstellung des pH auf 7,5 - 8,0 wurde der Überstand für die Messung des Gesamtglutathions direkt verwendet. Vor der Messung des oxidierten Glutathions muß nicht oxidiertes GSH in der Probe mit Vinylpyridin maskiert werden. Dazu wurden je 300 µl Probe mit 5 µl Vinylpyridin versetzt und 30 Minuten auf einem Rüttler inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 000 g, 5 min.) läßt sich die wässrige Phase für die weitere Messung von der öligen Vinylpyridin-Schicht abtrennen.

Die photometrische Analyse erfolgte bei 405 nm mittels kinetischem Recycling-Assay in 13 Zyklen, basierend auf der von Baker et al. modifizierten Methode nach Tietze (126-128). Dazu werden je 100 µl Probe mit einem Reaktionsgemisch aus NADPH, Glutathion-Reduktase und Kaliumphosphat-Puffer versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 35 µl einer DTNB-Lösung gestartet.

Die Berechnung der Glutathionkonzentration erfolgte mittels einer Standardkurve, die mit Glutathionlösungen der Konzentration 0,31 µM - 10 µM, erstellt wurde.

3.11 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Gewebeproben erfolgte mittels eines photometrischen Nachweise nach Lowry (129). Dazu wurden die Gewebeproben zunächst homogenisiert, mit Wasser und Aceton gewaschen und danach mit Natronlauge, Bicinochinic-Acid-Lösung und 4%-iger Kupfersulfatlösung versetzt. Danach erfolgte die photometrische Bestimmung der Lichtabsorption bei 562 nm, die proportional zum Proteingehalt der Probe ist. Mit Hilfe einer Standardkurve kann dann die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden.

3.12 RT-PCR ANALYSE DER NOS-2 UND HO-1 mRNA-EXPRESSION

Die Technik der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht den Nachweis auch sehr geringer Mengen mRNA in einer Gewebeprobe. Dazu wird aus dem zu

untersuchenden Gewebe die Gesamt-RNA isoliert und mit Hilfe einer reversen Transkriptase zu cDNA umgewandelt. Im nächsten Schritt, der eigentlichen Polymerase Kettenreaktion, werden dann die gewünschten Abschnitte der cDNA selektiv mit Hilfe spezifischer Primer und einer DNA-Polymerase amplifiziert und danach mittels Gelelektrophorese analysiert (130).

Durchführung:

Krykonservierte Gewebeproben wurden in einem RNA Extraktionsgemisch (4 M Guanidin-Thiocyanat, 25 mM Na-Zitrat, pH 7, 0,5% N-Lauroyl-Sarcosine, 0,1 M 2-Mercaptoethanol) aufgenommen und homogenisiert. Danach wurde das Homogenat mit Na-Acetat, Phenol und Chloroform- Isoamylalkohol versetzt und die mRNA ausgefällt. Dann wurde die RNA quantifiziert, in cDNA umgeschrieben und in der PCR zum Nachweis der gesuchten Gene eingesetzt (130,131).

Mit der gleichzeitigen Analyse eines sog. „house-keeping gene“, wie beta-actin, kann der Einsatz gleichmäßiger DNA Mengen in den untersuchten Proben kontrolliert werden.

Folgende Primer wurden von der Fa. INTERACTIVA, Ulm bezogen (131):

NOS-2	Antisense	5` CTG TAG TGT AAT CAC CAC AGC `3
	Sense	5` TTG GGT CTT GTT AGC CTA GTC `3
HO-1	Antisense	5 `ATG TTG AGC AGG AAG GCG GTC `3
	Sense	5` AAG GAG GTG CAC ATC CGT GCA `3
β-actin	Antisense	5` ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA `3
	Sense	5` CGG AAC CGC TCA TTG CC `3

PCR - Zyklen:

	NOS-2		HO-1		Beta-actin	
1	95° C	3 min.	94° C	5 min.	94° C	3 min.
2	95° C	30 sec	96° C	45 sec	94° C	1 min.
3	49° C	30 sec	65° C	45 sec	58° C	1 min.
4	72° C	1,5 min.	72° C	1 min.	72° C	2 min.
5	39 x	Zyklus 2 - 4	28 x	Zyklus 2 – 4	29 x	Zyklus 2 - 4
6	72° C	10 min.	72° C	10 min,	72° C	10 min.
7	4° C	∞	4° C	∞	4° C	∞

Die elektrophoretische Auftrennung des PCR Produkts erfolgt in einem 1%igem Agarosegel. Die Laufzeit beträgt ca. 1,5 Stunden bei einer angelegten Spannung von 80 V. Durch Zugabe von Ethidiumbromid können die Banden nach Beendigung des Laufvorgangs unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden (130).

3.12.1 Quantifizierung der Gen-Expression

Die Quantifizierung der NOS-2 und HO-1 mRNA Expression in Darm und Leber erfolgte mittels real-time PCR unter Verwendung des ABI PRISM® 7700 Sequence Detection Systems (Taq Man) (132).

Die Methode basiert auf der Verwendung der 5'Nukleaseaktivität der Taq Polymerase zur Abtrennung einer nicht amplifizierbaren Hybridisierungssequenz während der Amplifikationsphase der PCR. Dazu werden zweifach-markierte fluorogene Hybridisierungssequenzen verwendet. Der eine fluoreszierende Farbstoff (FAM, 6-carboxyfluorescein) dient zum Nachweis der abgetrennten Sequenz. Das Emissionsspektrum wird dabei vom zweiten Farbstoff (TAMRA, 6 carboxy-tetramethyl-rhodamine) gequencht. Die Reaktionen werden in Echtzeit

während der logarithmischen Phase der Amplifikation gemessen. Dabei verhält sich der Fluoreszenzanstieg des Nachweisfarbstoffes proportional zur Amplifikation der gesuchten Gensequenz. Die Anzahl der Zyklen, nach denen die Amplifikationskurve eine fixierte Schwelle oberhalb der baseline kreuzt, wird als Schwellenzyklus (C_s) definiert.

Um Unterschiede im cDNA Gehalt der verschiedenen Proben auszugleichen, werden alle Ergebnisse in Relation zur Konzentration eines sog. „house-keeping-gene“ gesetzt, dessen Expression konstant ist. In den vorliegenden Versuchen wurde β -actin als Kontrollgen eingesetzt.

Die Quantifizierung erfolgt nach der vergleichenden ΔC_s Methode. Dabei wird die Differenz zwischen der mittleren C_{sNOS-2} oder C_{sHO-1} und der mittleren $C_{s\beta\text{-Actin}}$ gebildet. Die mittleren C_{sNOS-2} , C_{sHO-1} und $C_{s\beta\text{-Actin}}$ Werte wurden durch Zweifachbestimmung ermittelt. Die relative Genexpression der untersuchten Sequenzen wird dann in einem einheitslosen Wert nach der Formel $2^{-\Delta C_s}$ angegeben.

Durchführung:

Die PCR wurde in einem Volumen von 25 μ l durchgeführt. Darin enthalten sind 1 μ l cDNA, 12,5 μ l Master Mix (TaqMan® Universal PCR Master Mix, Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland), 1 μ l Probe, 6 μ l Primer Mix und 5,5 μ l dest. Wasser.

Der erste Schritt von 2 min. bei 50°C beinhaltet die Aktivierung der Uracyl-n-Glukosylase und die Degradation kontaminierender RNA Sequenzen. Danach folgt die Denaturierung und der Start der AmpliTaq Gold DNA Polymerase bei 95°C für 10 min.. Die Amplifizierung erfolgt schließlich in einer Zweistufen PCR über 40 Zyklen (15 s Denaturierung bei 95°C und 1 min. annealing/extension bei 60°C).

3.13 NORTHERN BLOT ANALYSE DER NOS-2 mRNA-EXPRESSION

Das Prinzip der Northern Blot Analyse beruht auf einer elektrophoretischen Auftrennung der Gesamt-RNA einer Probe und nachfolgender Detektion der

gesuchten mRNA mittels Bindung an spezifische Gensequenzen. Durch die Verwendung von Proben gleicher RNA-Konzentration kann eine quantitative Aussage über die Expression der jeweiligen Gene gemacht werden (130).

Gewebeproben für die Northern Blot Analyse wurden von unbehandelten Kontrolltieren und von Tieren nach LPS-Injektion gewonnen und sofort in flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Als Negativ- und Positivkontrollen wurden unbehandelte und LPS-stimulierte RAW 264.7 Zellen verwendet (130).

Durchführung:

Jeweils 4 µg Kontroll - RNA und 20 µg RNA aus den Gewebeproben wurden in einem 1% Agarosegel mit 3% Formaldehyd elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde dann auf Gene Screen Membranen (Du Pont-New England Nuclear, USA) transferiert und unter ultraviolettem Licht autocrosslinked. Die Membranen wurden über Nacht mit einer Maus Makrophagen NOS-2 Sequenz (2.7 kilobase cDNA) bei 43°C in 50% deionisiertem Formamid, 0,25 M Natriumphosphat, 0,25 M NaCl-1 mM EDTA (pH 7.2), 7% Dodecylsulfat (SDS) und denaturierter Lachs Sperma DNA (100 µg/ml) hybridisiert. Die NOS-2 Sequenz wurde mittels eines random priming kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA) mit [³²P]dCTP markiert. Die hybridisierte Membran wurde dreimal bei 53°C in 2-fach konzentrierter Kochsalzlösung mit 0,1% SDS gewaschen. Danach wurden die Membranen zweimal in einer Lösung mit 25 mM Natriumphosphat, 1 mM EDTA und 0.1% SDS und zweimal in einer Lösung mit 25 mM Natriumphosphat, 1 mM EDTA und 1% SDS gewaschen. Die autoradiographische Darstellung erfolgte durch Belichtung eines Kodak X-Omat Films bei - 70°C für drei Tage mit Verwendung eines Verstärkerschirms. Danach wurde die Membran mit kochender 5 mM EDTA-0.1% SDS-Lösung gereinigt und mit einer spezifischen Gensequenz für 18S RNA rehybridisiert.

3.14 STATISTIK

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde aus allen Datensätzen der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), sowie die Standardabweichung (SD) berechnet. Der statistische Unterschied zwischen nicht

verbundenen Datensätzen wurde mit Hilfe des student's t-test ermittelt. Ein signifikanter Unterschied wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

4 ERGEBNISSE

4.1 IEL NACH DÜNNDARMTRANSPLANTATION

4.1.1 Phänotyp

Die Untersuchungen von IEL nach Dünndarmtransplantation konzentrierten sich zunächst auf die Frage, ob der Nachweis von Lymphozyten des Empfängers in der Dünndarmmukosa als Zeichen der akuten Abstoßung gewertet werden kann.

Dazu wurden allogene Dünndarmtransplantationen in der hoch immunogenen Kombination ACI (Spender) auf Lewis (Empfänger) durchgeführt. Dieses Modell ist durch eine akute Abstoßungsreaktion innerhalb der ersten Woche nach Transplantation gekennzeichnet (116,133).

Am 6. Tag nach Dünndarmtransplantation wurden Lymphozyten aus der Darmschleimhaut der transplantierten Tiere isoliert und der Anteil an Empfängerzellen durchflußzytometrisch bestimmt (Tabelle 1). Dazu wurde auf den isolierten Lymphozyten die Expression des Spender MHC Klasse I Antigens (RT-I^a) analysiert. Zellen, die RT-I^a aufwiesen, wurden als Spenderzellen, Zellen die negativ für RT-I^a waren, wurden als Empfängerzellen klassifiziert. Als Vergleichsgruppe dienten transplantierte Tiere, bei denen die akute Abstoßungsreaktion durch Behandlung mit Tacrolimus verhindert worden war (115,116).

Tabelle 1: Prozentualer Anteil der Empfängerlymphozyten in der Transplantatmukosa nach allogener Dünndarmtransplantation.

	akute Abstoßung	Tacrolimus
% Empfängerzellen	32,0 ± 2,5	14,6 ± 2,6 [*]

Am 6. postop. Tag wurden Lymphozyten aus der Darmschleimhaut isoliert und die Expression des Spender MHC I (RT-1^a) durchflußzytometrisch analysiert. Zellen, die kein RT-1^a exprimieren, wurden als Empfängerzellen klassifiziert. Die Meßwerte sind als Mittelwert ± SEM von fünf Ratten je Gruppe angegeben. ^{*}p<0,05 vs. akute Abstoßung

Es zeigte sich, daß bei akuter Abstoßung über 30% der Lymphozyten in der

Transplantatmukosa vom Empfänger stammten (Tabelle 1).

Im Gegensatz dazu stammten bei Tieren, die mit Tacrolimus behandelt worden waren und histologisch keine Zeichen der akuten Abstoßung aufwiesen (Daten nicht dargestellt), weniger als 15% der Lymphozyten in der Dünndarmmukosa vom Empfänger. Diese Ergebnisse zeigen, daß nach allogener Dünndarmtransplantation Lymphozyten des Empfängers sowohl bei akuter Abstoßung, als auch bei suffizienter Immunsuppression in der Transplantatmukosa nachweisbar sind. Bei akuter Abstoßung ist der Anteil von Lymphozyten des Empfängers in der Dünndarmmukosa jedoch signifikant größer als bei Tieren unter Immunsuppression.

Die nächsten Versuche dienten der phänotypischen Analyse der Empfängerzellen in der Transplantatmukosa. (Tabelle 2).

Tabelle 2: Phänotyp der Empfängerzellen in der Transplantatmukosa nach allogener Dünndarmtransplantation.

	Kontrolle	% Empfängerzellen	
		akute Abstoßung	Tacrolimus
CD3 ⁺	75,6 ± 1,2	86,5 ± 2,9	84,3 ± 4,1
CD4 ⁺	12,8 ± 1,0	15,6 ± 2,2	13,2 ± 0,9
CD8 ⁺	69,4 ± 2,9	78,0 ± 5,1	76,5 ± 5,3
αβTCR ⁺	67,7 ± 2,9	70,5 ± 3,9	71,2 ± 1,7

Lymphozyten wurden aus der Dünndarmmukosa am 6. Tag nach Transplantation isoliert und die Expression von Spender MHC I (RT-1^a) und verschiedener T-Zell Antigene durchflußzytometrisch analysiert. Zellen, die kein RT-1^a exprimieren, wurden als Empfängerzellen klassifiziert. Die Meßwerte sind als Mittelwert ± SEM von fünf Ratten je Gruppe angegeben. Als Kontrolle dienten IEL von syngen transplantierten ACI-Ratten. Die Gabe von Tacrolimus nach syngener Transplantation blieb ohne Einfluß auf den Phänotyp der isolierten IEL (Daten nicht dargestellt).

Die durchflußzytometrische Analyse der aus der Darmschleimhaut isolierten

Zellen ergab, daß die Empfängerzellen sowohl bei Tieren mit akuter Abstoßung als auch bei immunsupprimierten Tieren fast ausschließlich aus CD3⁺ T-Zellen mit einem dominanten CD4⁻CD8⁺ Phänotyp bestanden (Tabelle 2). Die Verteilung der Subpopulationen der infiltrierenden Zellen stimmte somit mit der nativer IEL überein, unterschied sich aber deutlich von peripheren Lymphozytenpopulationen, aus denen sich die infiltrierenden Empfängerzellen vermutlich rekrutierten.

Die Ähnlichkeit zwischen IEL und infiltrierenden Empfängerzellen zeigte sich auch bei der Expression des T-Zell Rezeptors (TCR) (Tabelle 2). Empfängerzellen bestanden ebenso wie IEL von Kontrolltieren zu lediglich 70% aus αβTCR⁺ Lymphozyten, wohingegen diese Zellen in peripheren Lymphozytenpopulationen meist über 95% der T-Zellen ausmachen.

Der Phänotyp der Empfängerzellen im Dünndarm war dabei unabhängig von immunsuppressiver Therapie oder Abstoßungsreaktionen. Sowohl in Tieren mit akuter Abstoßung als auch in immunsupprimierten Ratten wiesen die infiltrierenden Zellen einen Phänotyp ähnlich dem nativer IEL auf. Unbeeinflusst von der Abstoßungsreaktion und der Immunsuppression blieb auch der Phänotyp der Spender-IEL im Dünndarm (Daten nicht dargestellt).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Dünndarmmukosa nach Dünndarmtransplantation von Empfängerzellen infiltriert wird. Die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus bewirkte eine Verminderung dieser Infiltration, verhinderte sie jedoch nicht vollständig und blieb auch ohne Einfluß auf den Phänotyp der einwandernden Zellen.

4.1.2 Zytotoxizität

Eine der charakteristischen Eigenschaften der IEL ist ihre zytolytische Aktivität. In Übereinstimmung mit in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen (21,23,41) wiesen bereits IEL von unbehandelten Kontrolltieren eine unspezifische zytolytische Aktivität in vitro auf (Abb. 1A).

Diese war nach Dünndarmtransplantation unverändert nachweisbar und wurde weder durch akute Abstoßung noch durch immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus beeinflusst (Abb. 1A;B). Auch bei Kontrolltieren verursachte die

Behandlung mit Tacrolimus keine Veränderung der unspezifischen zytolytischen Aktivität der isolierten IEL.

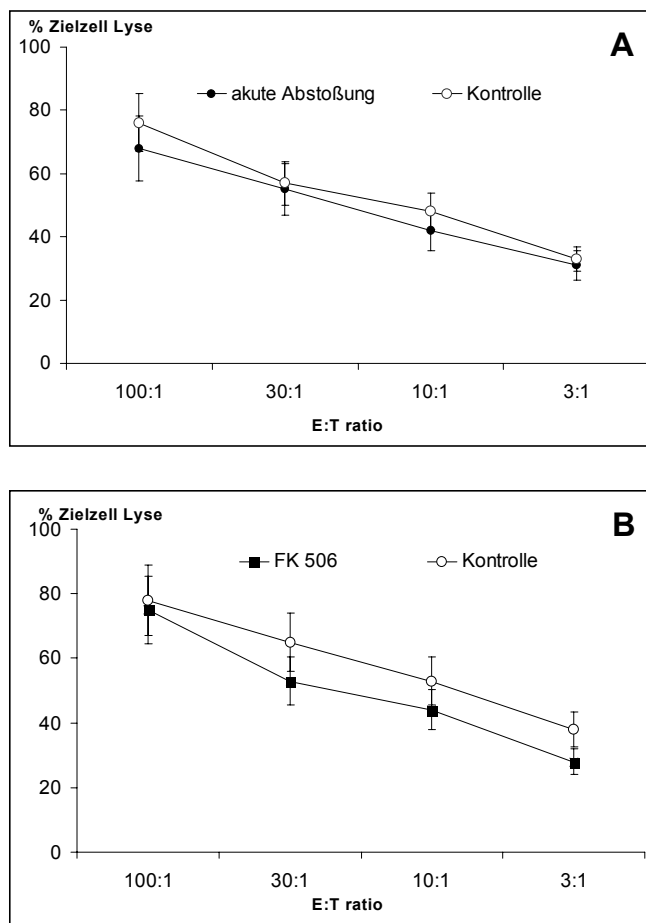


Abbildung 1: Unspezifische zytolytische Aktivität isolierter IEL nach allogener Dünndarmtransplantation.

IEL wurden am 6. Tag nach Transplantation von Tieren mit akuter Abstoßung (schwarze Kreise A), von immunsupprimierten Tieren (schwarze Quadrate B), oder von syngen transplantierten Kontrolltieren (weiße Kreise A, B) isoliert. Die unspezifische zytolytische Aktivität der IEL wurde gegenüber Zellen der Maus-Tumorzelllinie P815 nach Zugabe von PHA (0,5 µg/ml) in einem ^{51}Cr -Freisetzungsversuch bestimmt. Die Ergebnisse sind als % Zielzell Lyse bei verschiedenen Effektor:Target Ratios angegeben (jeweils Mittelwert \pm SEM von drei Experimenten je Gruppe).

Ohne Bedeutung für die unspezifische zytolytische Aktivität der IEL war auch der Anteil von Empfängerzellen in der Dünndarmmukosa. So zeigte sich kein

Unterschied in der zytolytischen Aktivität von IEL von Tieren mit oder ohne Abstoßung, obgleich bei Tieren mit akuter Abstoßung signifikant mehr Empfängerzellen in der Darmschleimhaut nachweisbar waren als bei Tieren ohne akute Abstoßung (siehe Tabelle 1).

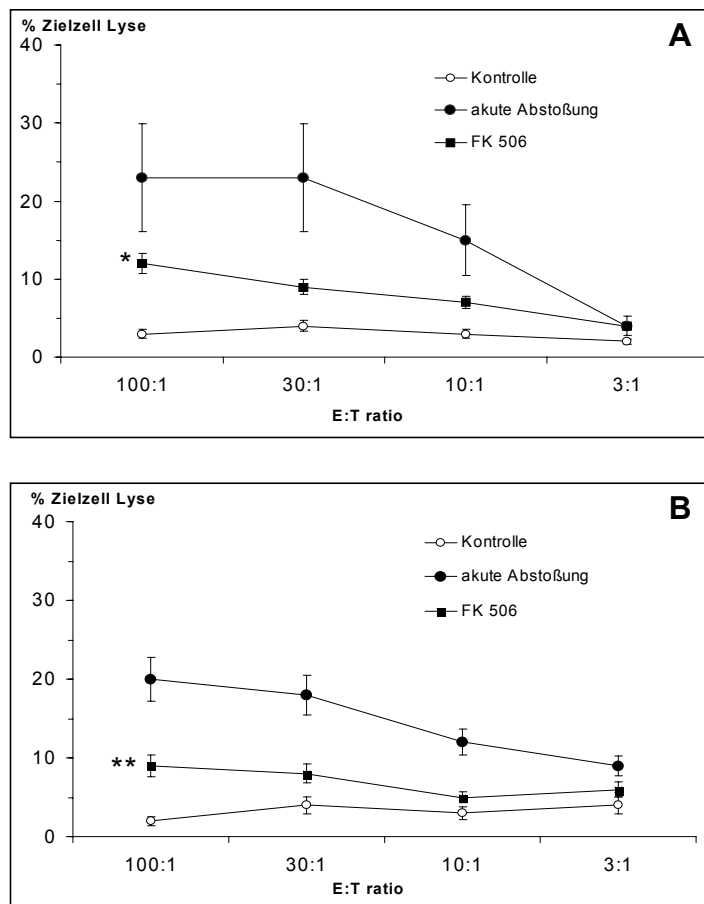


Abbildung 2: Spezifische zytolytische anti-Spender- (A) und anti-Empfänger- (B) Aktivität isolierter IEL nach allogener Dünndarmtransplantation.

IEL wurden am 6. Tag nach Transplantation von Tieren mit akuter Abstoßung (schwarze Kreise), von immunsupprimierten Tieren (schwarze Quadrate), oder von syngen transplantierten Kontrolltieren (weiße Kreise) isoliert und analysiert. Die spezifische zytolytische Aktivität der IEL wurde gegenüber PHA Blasten von Spender (A) oder Empfänger (B) in einem $^{51}\text{[Cr]}$ -Freisetzungsversuch bestimmt. Die Ergebnisse sind als % Zielzell Lyse bei verschiedenen Effektor:Target Ratios angegeben (Mittelwert \pm SEM von drei separaten Experimenten je Gruppe).
 * $p < 0,05$ vs. akute Abstoßung, ** $p < 0,01$ vs. akute Abstoßung.

Ein anderes Bild zeigte sich bei der Analyse der spezifischen zytolytischen anti-Spender-Aktivität der isolierten Lymphozyten aus der Dünndarmmukosa (Abb. 2).

Wie erwartet war bei IEL von syngen transplantierten Kontrolltieren keine spezifische anti-Spender-Aktivität nachweisbar.

IEL von Tieren mit akuter Abstoßung wiesen hingegen eine spezifische anti-Spender-Aktivität auf (Abb. 2A). Träger dieser anti-Spender-Aktivität sind vermutlich infiltrierende Lymphozyten des Empfängers, die möglicherweise so zur Gewebeerstörung des Transplantats bei akuter Abstoßung beitragen (47). Bei Tieren, die zur Abstoßungsprophylaxe mit Tacrolimus behandelt wurden, war eine signifikante Verminderung der spezifischen anti-Spender-Aktivität der isolierten IEL zu beobachten (Abb. 2A).

Es bleibt allerdings offen, ob die Verminderung der spezifischen anti-Spender-Aktivität bei den mit Tacrolimus behandelten Tieren Resultat einer direkten immunsuppressiven Wirkung von Tacrolimus war. Denkbar ist auch eine Herabsetzung der spezifischen anti-Spender-Aktivität bei diesen Tieren aufgrund des geringeren Anteils an Empfängerzellen in der Dünndarmmukosa (siehe Tabelle 1).

Abhängig von der Kombination der Empfänger- und Spendertiere kann der Verlauf nach Dünndarmtransplantation bei Ratten erheblich variieren (133,1134). In der hier verwendeten Kombination von ACI Spendern und Lewis Empfängern entwickelt sich typischerweise innerhalb einer Woche eine schwere akute Abstoßung des Transplantats, wohingegen Symptome einer Graft-versus-Host-Reaktion fehlen (133).

Überraschenderweise wiesen IEL von Tieren mit akuter Rejektion aber nicht nur die für die Abstoßung typische anti-Spender-Aktivität auf, sondern zeigten auch eine spezifische zytolytische Aktivität gegenüber Empfängerzellen wie bei Graft-versus-Host-Reaktion (Abb. 2B). Diese zytolytische anti-Empfänger- (anti-Host) Aktivität ließ sich ebenso wie die anti-Spender-Aktivität (siehe Abb. 2A) durch immunsuppressive Behandlung der Tiere mit Tacrolimus reduzieren (Abb. 2B).

Diese Ergebnisse zeigen, daß es nach Dünndarmtransplantation zu einer Migration von Empfängerzellen in die Darmschleimhaut unabhängig von einer

Abstoßungsreaktion kommen kann. Die infiltrierenden Zellen weisen dabei eine spezifische anti-Spender-Aktivität auf, die zur Gewebeerstörung des Transplantats bei akuter Abstoßung beitragen kann. Zusätzlich zeigt sich in diesem von akuter Abstoßung dominierten Modell auch eine Graft-versus-Host-Aktivität isolierter Lymphozyten im Darm.

Die spezifische zytolytische Aktivität konnte durch immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus reduziert werden, wohingegen die unspezifische Aktivität weder durch Immunsuppression noch durch Abstoßungsreaktionen beeinflusst wurde.

4.2 IEL BEI AKUTER GRAFT VERSUS HOST REAKTION

4.2.1 Phänotyp

Akute GvHR ist das immunologische Gegenstück zur akuten Abstoßung und kann in Mäusen durch Injektion elterlicher Milzzellen in unbehandelte F1 Nachkommen induziert werden (49-51). Dabei kommt es im Verlauf der Erkrankung zur Infiltration der Empfängerorgane mit Lymphozyten des Spenders und zur Gewebeerstörung insbesondere im Gastrointestinaltrakt, der Leber und der Haut (53-55).

Das Ausmaß und der Verlauf der Infiltration der Dünndarmmukosa durch Spenderzellen wurde im wöchentlichen Abstand nach Induktion der GvHR analysiert (Abb.3). Dazu wurde mittels Zweifarben-Durchflußzytometrie die Expression von Spender- (H-2^b) und Empfänger- (H-2^{b,d}) MHC auf isolierten Lymphozyten bestimmt. Zellen, die sowohl H-2^d als auch H-2^b exprimierten, wurden als Empfängerzellen angesehen, während Zellen, die nur H-2^b aufwiesen, als Spenderzellen galten.

Im Verlauf der GvH-Erkrankung konnte eine kontinuierliche Zunahme des prozentualen Anteils an Spenderzellen im Dünndarm festgestellt werden. Diese Infiltration mit Spenderzellen war bei akuter GvHR nicht auf den Darm beschränkt, sondern konnte auch in anderen Organen, wie z.B. der Milz beobachtet werden. (Abb. 3).

Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Organen bezüglich des Ausmaßes der Spenderzellinfiltration war nur in der ersten Woche nach Induktion der GvHR nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt waren deutlich weniger Spenderzellen im

Dünndarm als in der Milz zu beobachten ($p < 0,01$). Im weiteren Verlauf der Erkrankung verschwand dieser Unterschied und in beiden Organen zeigte sich ein kontinuierlich steigender Anteil an Spenderzellen (Abb.3).

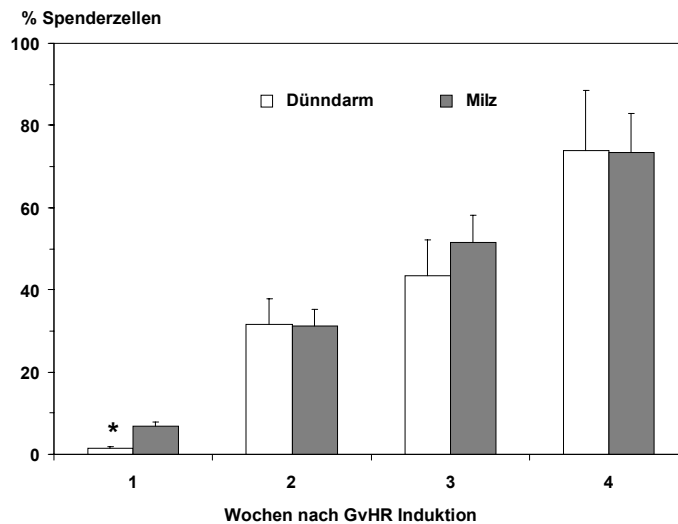


Abbildung 3: Prozentualer Anteil der Spenderlymphozyten in Dünndarm und Milz während akuter GvHR.

Wöchentlich nach GvHR Induktion wurde die Expression von Spender ($H-2^b$) und Empfänger ($H-2^{b,d}$) MHC durchflußzytometrisch auf isolierten Lymphozyten aus Milz (weiße Balken) und Dünndarm (graue Balken) bestimmt. Als Spenderzellen wurden $H-2^{d-b+}$ Lymphozyten angesehen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM von vier verschiedenen Experimenten mit jeweils 5 Tieren dargestellt. * $p < 0,01$ vs. Milz.

Die nächsten Experimente dienten der phänotypischen Analyse der infiltrierenden Spenderzellen in der Darmschleimhaut. Dabei konnte gezeigt werden, daß sich die Spenderzellen in der Darmschleimhaut erheblich von der ursprünglich injizierten Lymphozytenpopulation unterschieden (Tabelle 3).

Während von den ursprünglich injizierten Milzlymphozyten über 50% B-Zellen und nur 40% T-Zellen gewesen waren, bestanden die Spenderzellen im Darm zu jedem Zeitpunkt nur aus $CD3^+$ T-Zellen. Diese T-Zellen waren überwiegend $CD4^- CD8^+$, während in der ursprünglich injizierten Zellsuspension $CD4^+ CD8^-$ Zellen überwogen hatten.

Tabelle 3: Phänotyp der Spenderzellen in der Dünndarmmukosa bei akuter Graft versus Host Reaktion.

	% Spenderlymphozyten				Kontrolle	
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	>3 Monate	IEL	Milz
CD3 ⁺	91,1 ± 4,9	94,4 ± 2,4	97,1 ± 0,7	97,4 ± 1,2	92,0 ± 1,0	40,1 ± 2,8
CD4 ⁺	12,7 ± 4,2	8,1 ± 3,4	7,8 ± 0,5	15,5 ± 4,3	15,1 ± 2,8	22,3 ± 0,5
CD8 ⁺	85,2 ± 6,2	92,1 ± 1,9	91,6 ± 1,9	86,1 ± 2,3	78,6 ± 1,4	14,7 ± 1,4
CD20 ⁺	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2	52,0 ± 1,5
αβTCR ⁺	94,2 ± 1,6	95,3 ± 1,9	94,3 ± 1,6	43,2 ± 7,9	35,7 ± 3,5	95,7 ± 3,2
γδTCR ⁺	2,9 ± 1,4	1,9 ± 0,7	1,7 ± 0,7	39,3 ± 9,2	54,8 ± 2,2	3,8 ± 2,0

Wöchentlich nach GvHR Induktion wurde die Expression der T-Zell Antigene, sowie von Spender (H-2^b) und Empfänger (H-2^{b,d}) MHC durchflußzytometrisch auf isolierten IEL bestimmt. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Spenderzellen (H-2^{b+} H-2^{d-}), die das jeweilige Oberflächenantigen aufweisen. Die Meßwerte sind als Mittelwert ± SEM von mindestens je 3 Experimenten dargestellt. Als Kontrolle dienten IEL von unbehandelten F1 Tieren, sowie Milzzellen von C57BL/6 Spendertieren.

Bei der Analyse der TCR-Expression fanden sich unterschiedliche Ergebnisse im frühen und späten Stadium der Erkrankung.

Während des ersten Monats nach GvHR-Induktion waren fast ausschließlich αβTCR⁺ Spenderzellen im Darm nachweisbar. Dies entsprach der ursprünglich injizierten Zellsuspension, die überwiegend αβTCR⁺ T-Zellen enthalten hatte. Drei Monate nach GvHR-Induktion waren jedoch nur noch knapp die Hälfte der Spenderzellen αβTCR⁺ und es fand sich ein Anteil von fast 40% γδTCR⁺ Spenderzellen im Darm (Tabelle 3).

Im Verlauf von mehreren Monaten hatten die infiltrierenden Spenderzellen sich somit nicht nur hinsichtlich der Verteilung der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen dem Phänotyp der IEL angeglichen, sondern ähnelten IEL auch in der Verteilung von

$\gamma\delta$ TCR (Tab. 3). Der Phänotyp der Empfänger IEL blieb hingegen über den gesamten Untersuchungszeitraum unverändert (Daten nicht aufgeführt).

Eine Besonderheit der IEL ist ihr hoher Anteil an $CD8\alpha\alpha$ Lymphozyten (4,18). Im Gegensatz dazu sind $CD8^+$ Zellen anderer peripherer Lymphozytenpopulationen überwiegend als $CD8\alpha\beta$ charakterisiert.

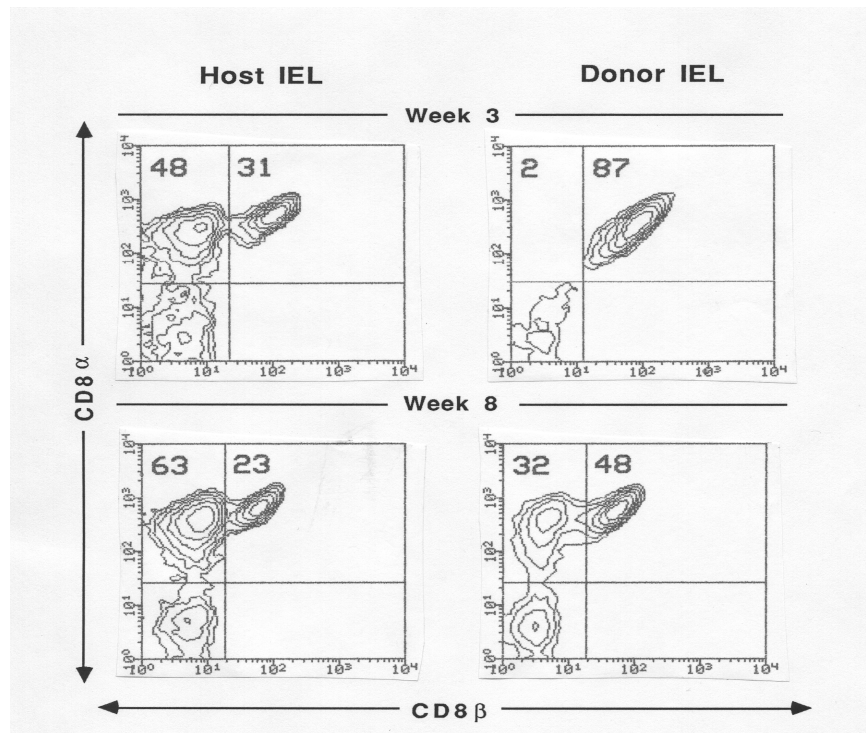


Abbildung 4: Prozentualer Anteil von $CD8\alpha\alpha$ und $CD8\alpha\beta$ Spender und Empfänger IEL bei akuter GvHR.

3 Wochen (oben) und 8 Wochen (unten) nach GvHR Induktion wurde die Expression von $CD8\alpha$, $CD8\beta$, sowie Empfänger ($H-2^d$) MHC auf isolierten IEL mittels Dreifarbindurchflußzytometrie bestimmt. Angegeben ist der prozentuale Anteil der $H-2^d$ Spenderzellen (links), bzw. $H-2^{d+}$ Empfängerzellen (rechts), die $CD8\alpha$ oder $CD8\beta$ exprimieren. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment. Als Kontrollen dienten IEL von unbehandelten F1 Tieren, sowie Milzzellen von C57BL/6 Spendertieren.

Um zu klären, ob die Spenderzellen im Darm bei akuter GvHR den homodimeren $CD8\alpha\alpha$ Rezeptor oder den heterodimeren $CD8\alpha\beta$ Rezeptor aufwiesen, wurde mittels Dreifarben-Durchflußzytometrie der Anteil von Spender ($H-2^d$) und Empfänger ($H-2^{d+}$) IEL, die $CD8\alpha\alpha$ oder $CD8\alpha\beta$ exprimierten, ermittelt (Abb. 4).

Drei Wochen nach Induktion der GvHR bestanden die Spenderzellen überwiegend aus CD8 $\alpha\beta$ Zellen und entsprachen damit dem Verhältnis von CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta$ der ursprünglich injizierten Zellpopulation.

Acht Wochen nach GvHR Induktion zeigte sich hingegen eine Zunahme der CD8 $\alpha\alpha$ Zellen innerhalb der Spender IEL. Die Spenderzellen wiesen zu diesem Zeitpunkt somit eine Verteilung von CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta$ auf, wie IEL von unbehandelten IEL.

Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese einer selektiven Migration von Lymphozyten mit einem „IEL-ähnlichen“ Phänotyp in die Darmschleimhaut nach Dünndarmtransplantation oder akuter GvHR

Zur weiteren Charakterisierung der Spenderzellen in der Darmschleimhaut bei akuter GvHR wurde die Häufigkeit verschiedener V β – Populationen durchflußzytometrisch analysiert. (Tabelle 4). Da die Spenderzellen im Darm überwiegend vom Typ CD8 $^+\alpha\beta$ TCR $^+$ waren (siehe Tabelle 3) wurden CD8 $^+$ Milzzellen und $\alpha\beta$ TCR $^+$ IEL von unbehandelten C57BL/6J Spendertieren als Kontrollen verwendet.

In Übereinstimmung mit in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen (6) waren im Darm von normalen C57BL/6 Mäusen V β 5, V β 6 und V β 11 positive T-Zellen seltener anzutreffen als in der Milz dieser Tiere (Tabelle 4). Derartige Unterschiede zwischen den beiden Organen waren hingegen bei der Analyse von V β 7, V β 8, V β 9 und V β 14 positiven Lymphozyten nicht nachzuweisen.

Im Verlauf der akuten GvHR enthielten die Spenderzellen im Dünndarm signifikant weniger V β 5, V β 6 und V β 11 positive Zellen als die CD8 $^+$ Milzzellen der Kontrolltiere. Im Gegensatz dazu war die Verteilung der verschiedenen V β der Spenderzellen identisch mit der V β Verteilung der IEL von Kontrolltieren (Tabelle 4). Somit unterschieden sich die Spenderzellen im Dünndarm hinsichtlich ihrer V β Verteilung von der ursprünglich injizierten Zellpopulation. Gleichzeitig glichen die Spenderzellen in ihrer V β Verteilung „normalen“ IEL.

Tabelle 4: V β Repertoire der Spenderzellen im Dünndarm bei akuter GvHR.

	Kontrollen		GvHR Spender IEL (%)	
	CD8 ⁺ Milzzellen	$\alpha\beta$ TCR ⁺ IEL	Woche 2	Woche 3
V β 5	10,8 \pm 2,8	5,0 \pm 0,6 [*]	3,0 \pm 1,5 [*]	4,7 \pm 1,5 [*]
V β 6	7,1 \pm 0,1	3,3 \pm 0,6 ^{**}	4,7 \pm 0,6 [*]	3,7 \pm 0,4 ^{**}
V β 7	6,0 \pm 0,7	4,9 \pm 0,4	5,8 \pm 2,7	6,8 \pm 1,6
V β 8	13,5 \pm 0,8	14,4 \pm 0,8	12,1 \pm 0,5	14,4 \pm 1,9
V β 9	3,0 \pm 0,5	2,9 \pm 0,7	3,1 \pm 0,7	1,6 \pm 0,3
V β 11	8,6 \pm 0,8	5,1 \pm 1,2 [*]	4,6 \pm 0,6 [*]	5,6 \pm 0,8 [*]
V β 14	2,8 \pm 0,1	3,4 \pm 0,3	2,8 \pm 0,5	3,2 \pm 0,7

Lymphozyten wurden - wie in Material und Methoden beschrieben - isoliert. Als Kontrollpopulation dienten CD8⁺ Milzzellen und $\alpha\beta$ TCR⁺ IEL von unbehandelten C57BL/6 Tieren. In den Kontrollen wurde mittels Zweifarben-Durchflußzytometrie der prozentuale Anteil der verschiedenen V β Antigene bei CD8⁺ Milzzellen und $\alpha\beta$ TCR⁺ IEL bestimmt. Bei GvHR Tieren wurde der prozentuale Anteil der Spenderlymphozyten (H-2^d negativ) bestimmt, die das jeweilige V β Antigen exprimieren. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM von 4 separaten Experimenten. ^{*}p<0,04 vs. CD8⁺ Milzzellen, ^{**}p<0,001 vs. CD8⁺ Milzzellen.

Diese Ergebnisse deuten entweder auf eine bevorzugte Migration bestimmter T-Zellsubpopulationen in den Darm bei akuter GvHR oder auf ein verbessertes Überleben dieser Spendersubpopulationen. Gegen die dritte Möglichkeit der Expansion einzelner V β Subpopulationen der Spenderzellen bei akuter GvHR spricht, daß zwischen der zweiten und dritten Woche nach GvHR Induktion keine Veränderung in der V β Verteilung der Spenderzellen zu beobachten war (Tabelle 4).

Wie auch bei den vorangegangenen Untersuchungen waren zu keinem Untersuchungszeitpunkt Veränderung der Empfänger IEL hinsichtlich ihrer V β

Verteilung nachzuweisen (Daten nicht aufgeführt).

Zusammengefaßt zeigte sich bei der phänotypischen Analyse isolierter Lymphozyten bei akuter Graft-versus-Host-Reaktion eine kontinuierliche Zunahme der Spenderzellen in den untersuchten lymphatischen Organen. Im Dünndarm wiesen die Spenderzellen einen „organ-spezifischen“ Phänotyp auf, d.h. sie zeigten eine Verteilung der Subpopulationen wie native IEL und unterschieden sich somit erheblich von den injizierten Milzzellen. Die infiltrierenden Spenderzellen im Dünndarm bestanden ausschließlich aus $CD3^+$ T-Zellen mit einem dominanten $CD8^+$ Phänotyp. Zusätzlich stimmten die Spenderzellen auch in der Verteilung verschiedener $V\beta$ Subtypen mit IEL überein. Im Verlauf der Erkrankung zeigten sich außerdem innerhalb der Spenderpopulation eine Zunahme der für IEL typischen $\gamma\delta TCR^+$ T-Zellen sowie $CD8\alpha\alpha^+$ Lymphozyten.

4.2.2 Zytotoxizität

Als Motor der Gewebeerstörung in den verschiedenen Zielorganen der Graft-versus-Host-Reaktion werden infiltrierende Spenderzellen mit spezifischer anti-Host- (=anti-Empfänger) Aktivität angesehen (49). Um nachzuweisen, ob IEL während GvHR eine derartige spezifische Zytotoxizität aufweisen, wurden IEL aus dem Dünndarm isoliert und ihre zytolytische Aktivität gegenüber Zellen der Mastozytomzelllinie P815, die Empfänger MHC ($H-2^d$) exprimieren, getestet (Abb. 5).

Wie erwartet wiesen IEL von unbehandelten F1 Kontrolltieren keine spezifische anti-Host-Aktivität gegenüber P815 Zellen auf (Abb. 5A-D).

In der ersten Woche nach GvHR Induktion war keine spezifische anti-Host-Aktivität der isolierten IEL nachweisbar. (Abb. 5A). Zu diesem frühen Zeitpunkt waren allerdings auch noch weniger als 2% der Lymphozyten in der Dünndarmmukosa Spenderzellen. (siehe Abb. 3). Dagegen war zwei Wochen nach Induktion der GvHR eine signifikant gesteigerte ($p < 0.01$ versus Kontrolle bei E:T Ratio 200:1) anti-Host-Aktivität der isolierte IEL nachweisbar (Abb. 5B). Diese Aktivität richtete sich spezifisch gegen die $H-2^d$ positiven („Empfänger“) P815 Zellen, wohingegen bei den isolierten Zellen keine zytolytische Aktivität gegenüber

H-2^b positiven („Spender“) EL-4 Zellen beobachtet wurde (Daten nicht abgebildet).

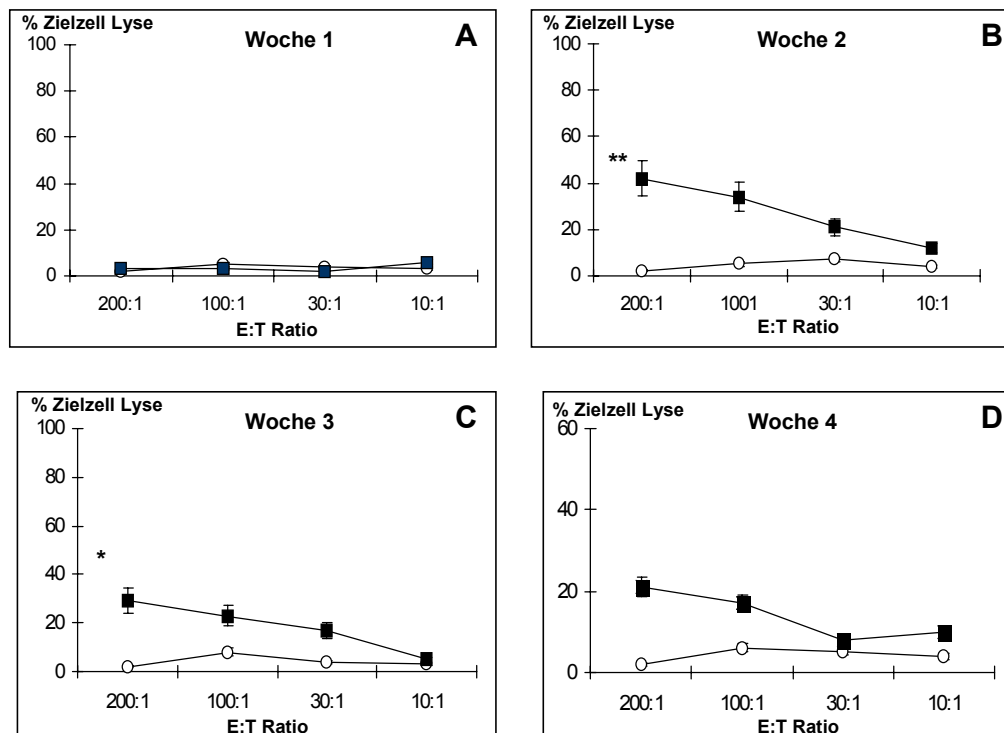


Abbildung 5: Spezifische zytolytische Aktivität isolierter IEL bei akuter GvHR.

IEL wurden wöchentlich nach GvHR Induktion von unbehandelten F1 Kontrolltieren (weiße Kreise) und von Tieren mit GvHR (schwarze Quadrate) isoliert. Die spezifische zytolytische Aktivität der isolierten IEL wurde gegenüber Zellen der Maus Mastocytomlinie P815 (H-2^d = Empfänger) in einem ⁵¹[Cr]-Freisetzungversuch bestimmt. Die Ergebnisse sind als % Zielzell Lyse bei verschiedenen Effektor : Zielzell Ratios angegeben (jeweils als Mittelwert ± SEM von drei separaten Experimenten). Die spezifische Aktivität gegenüber Spenderzellen (EL-4 Zellen, H-2^b) lag immer <5%. * p<0,05 vs. Kontrolle, ** p<0,01 vs. Kontrolle.

In der dritten Woche nach GvHR-Induktion war ein Abfall der zytolytischen Aktivität nachweisbar, obgleich der Anteil an Spenderzellen im Dünndarm weiter zugenommen hatte. (Abb. 5C). Im Vergleich zur Aktivität der IEL von Kontrolltieren war die zytolytische Aktivität aber noch immer signifikant erhöht (p<0.01, E:T Ratio 200:1).

Vier Wochen nach GvHR-Induktion (Abb. 5D), war kein Unterschied zwischen Kontrolltieren und GvHR-Tieren bezüglich der spezifischen Zytotoxizität mehr

nachweisbar ($p > 0.05$). Auch zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung war keine erhöhte spezifischen Zytotoxizität der isolierten IEL mehr nachweisbar (Daten nicht dargestellt).

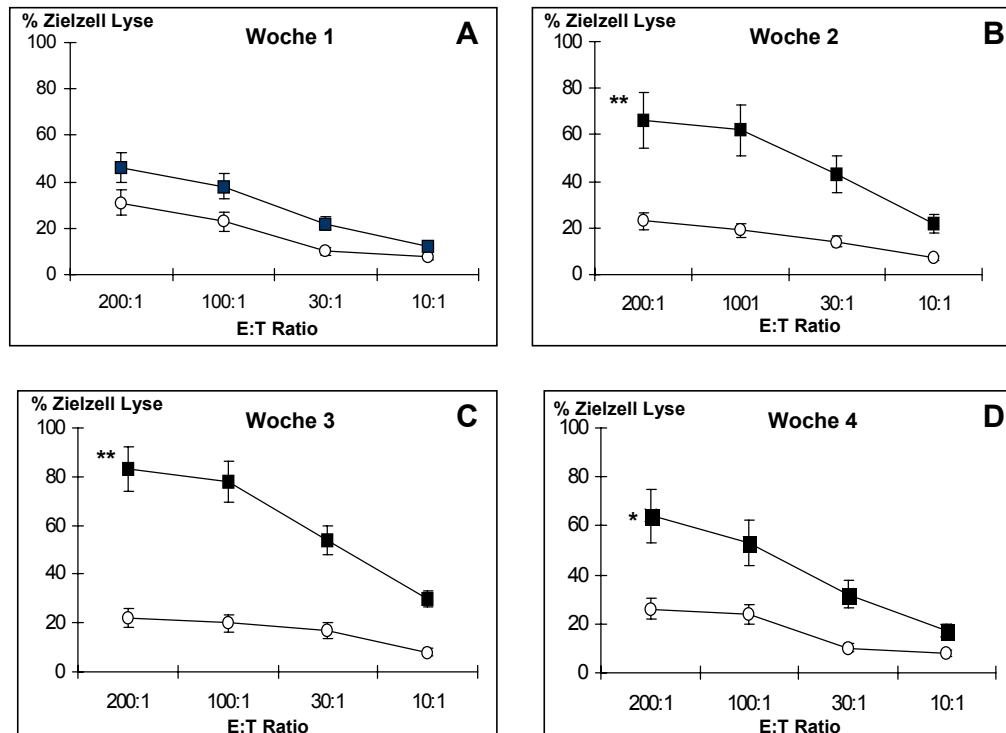


Abbildung 6: Unspezifische zytolytische Aktivität isolierter IEL bei akuter GvHR.

IEL wurden wöchentlich nach Induktion der GvHR von unbehandelten F1 Kontrolltieren (weiße Kreise) und von Tieren mit GvHR (schwarze Quadrate) isoliert. Die CD3-vermittelte unspezifische zytolytische Aktivität der isolierten IEL wurde gegenüber Fc-Rezeptor-positiven Zellen der Maus-Mastocytomlinie P815 in einem ^{51}Cr -Freisetzungsversuch bestimmt. Die Ergebnisse sind als % Zielzell Lyse bei verschiedenen Effektor : Zielzell Ratios angegeben (Mittelwert \pm SEM von drei separaten Experimenten). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

Eine weitere charakteristische Funktion der IEL ist ihre unspezifische zytolytische Aktivität, die durch anti-CD3 vermittelte Koppelung der Lymphozyten an Fc-Rezeptor positive Zielzellen ausgelöst werden kann (21,23,30-32). In Übereinstimmung mit diesen in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen ließ sich eine anti-CD3 vermittelte zytolytische Aktivität auch bei isolierten IEL von Kontrolltieren auslösen (Abb. 6).

In Tieren mit akuter GvHR war diese unspezifische zytolytische Aktivität ab der zweiten Woche der Erkrankung deutlich erhöht ($p < 0.01$ vs. Kontrolle bei E:T Ratio 200:1) (Abb. 6B) und erreichte Spitzenwerte während der dritten Woche nach GvHR Induktion (Abb. 6C) ($p < 0.003$ vs. Kontrolle, bei E:T Ratio 200:1).

Vier Wochen nach GvHR-Induktion (Abb. 6D) war noch eine gegenüber der Kontrolle signifikant gesteigerte zytolytische Aktivität der IEL nachweisbar, wenngleich diese Aktivität im Vergleich zu Woche 2 und 3 nach GvHR Induktion bereits wieder abgenommen hatte.

Im weiteren Verlauf kam es zu einer stetigen Reduktion der unspezifischen Zytotoxizität der isolierten IEL, und 6 Monate nach GvHR-Induktion war kein Unterschied zwischen GvHR-Tieren und Kontrolltieren mehr nachweisbar (Daten nicht dargestellt).

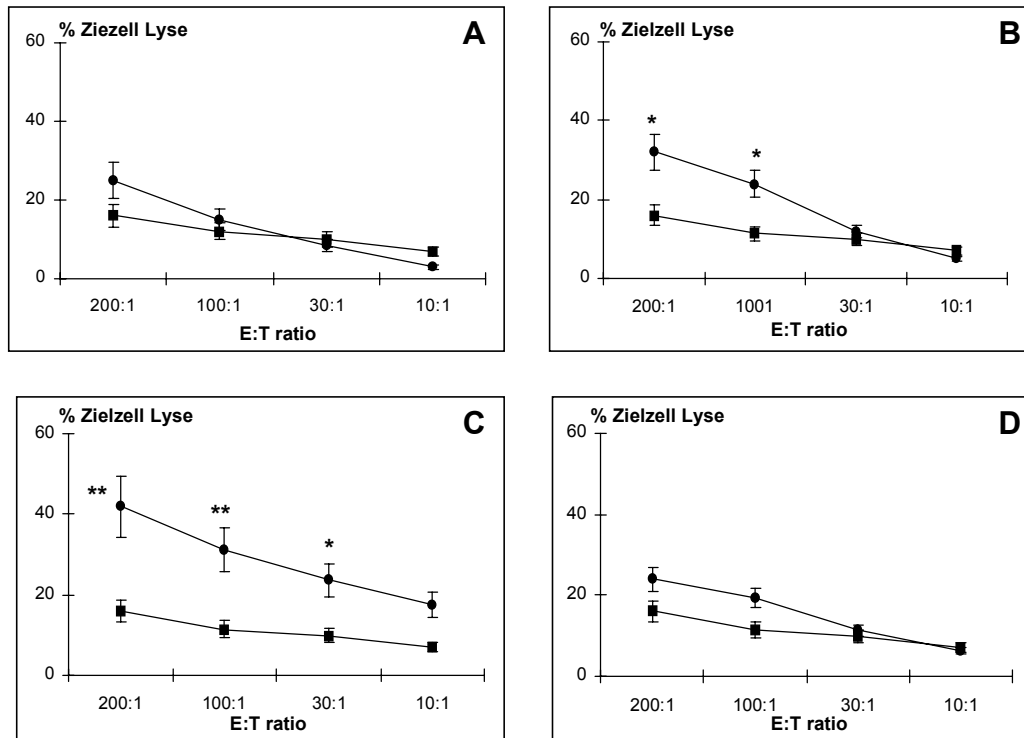
Zusammengefaßt läßt sich bei akuter GvHR eine kontinuierliche Migration von Spenderzellen in die Dünndarmmukosa nachweisen. Ähnlich wie bei Ratten nach Dünndarmtransplantation weisen die infiltrierenden Zellen einen Phänotyp auf, der identisch ist mit dem nativer IEL. Zusätzlich kommt es im Verlauf der GvHR zu einer vorübergehenden erheblichen Steigerung sowohl der unspezifischen wie auch der spezifischen zytolytischen Aktivität isolierter Lymphozyten.

4.3 IEL BEI SEPSIS

4.3.1 Zytotoxizität

Septikämie als Modell einer gram-negativen Infektion wurde durch intravenöse Gabe von 2,5 mg/kg *E. coli* LPS in C57BL/6 Mäusen ausgelöst. In dieser Dosierung führt LPS bei den Tieren zu einem nicht-letalen septischen Krankheitsbild, das durch Fieber, Zytokinfreisetzung, Gewichtsabnahme und reduzierte Nahrungsaufnahme charakterisiert ist. (119,135).

Wie bereits gezeigt (siehe Abb. 6), weisen IEL von Mäusen eine unspezifische zytolytische Aktivität auf, die sich in einem $^{51}\text{[Cr]}$ -Freisetzungsversuch demonstrieren läßt. Nach Injektion von LPS war diese unspezifische zytolytische Aktivität der IEL signifikant gesteigert (Abb. 7).



Abbildungung 7: Unspezifische zytolytische Aktivität isolierter IEL nach Septikämie

IEL wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Sepsisinduktion von unbehandelten Kontrolltieren (Quadrate) und von Tieren mit Septikämie (Kreise) isoliert. Die CD3-vermittelte unspezifische zytolytische Aktivität der isolierten Zellen wurde gegenüber Fc-Rezeptor-positiven Zellen der Maus Mastocytomlinie P815 in einem ^{51}Cr -Freisetzungsversuch bestimmt. Inkubationsdauer 4 Stunden. Die Ergebnisse sind als % Zielzell Lyse bei verschiedenen Effektor : Zielzell Ratios angegeben (jeweils als Mittelwert \pm SEM von drei separaten Experimenten je Gruppe). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

Eine Erhöhung der zytolytischen Aktivität der IEL war sechs Stunden nach Septikämie noch nicht nachweisbar (Abb. 8A), wohingegen 12 und 24 Stunden nach Septikämie die zytolytische Aktivität der IEL signifikant erhöht war (Abb. 8B,C). 48 Stunden nach Septikämie war die zytolytische Aktivität wieder auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt (Abb. 8D).

Eine Erklärung für die gesteigerte zytolytische Aktivität der IEL nach Septikämie basiert entweder auf der Vorstellung einer funktionellen Aktivierung existierender Zellen, oder der Expansion einer oder mehrerer zytolytisch aktiver

Subpopulationen der IEL.

4.3.2 Phänotyp

Zur Klärung dieser Fragestellung erfolgte die phänotypische Analyse der IEL zu verschiedenen Zeitpunkten nach Septikämie mittels Zweifarben-Durchflußzytometrie (Tabelle 5).

Tabelle 5: Phänotyp isolierter IEL nach LPS-Injektion.

	Zeitpunkt nach LPS-Injektion			
	Kontrolle	12 Stunden	24 Stunden	48 Stunden
CD3 ⁺	88,9 ± 2,8	89,8 ± 2,7	92,4 ± 1,2	92,7 ± 0,1
CD3 ⁺ CD4 ⁺	4,3 ± 0,5	4,6 ± 1,4	3,0 ± 1,1	3,6 ± 1,0
CD3 ⁺ CD8α ⁺	80,1 ± 3,6	79,9 ± 3,3	82,1 ± 0,5	84,5 ± 1,8
CD3 ⁺ αβTCR ⁺	26,0 ± 1,1	27,7 ± 1,0	24,1 ± 1,4	25,8 ± 1,0
CD3 ⁺ γδTCR ⁺	65,1 ± 3,5	61,7 ± 3,5	67,9 ± 1,6	66,9 ± 1,2

IEL wurden aus der Dünndarmschleimhaut von Mäusen nach Gabe von 2,5 mg/kg LPS und von unbehandelten Kontrolltieren isoliert. Mittels Zweifarbindurchflußzytometrie wurde die Expression verschiedener T-Zell-Antigene analysiert und der prozentuale Anteil der verschiedenen Subpopulationen ermittelt. Angegeben sind Mittelwert ± SEM von drei separaten Experimenten.

Zu keinem Zeitpunkt nach LPS-Gabe konnte eine phänotypische Veränderung der isolierten IEL nachgewiesen werden. Zu allen untersuchten Zeitpunkten bestanden die IEL fast ausschließlich aus CD3⁺ T-Zellen mit einem vorherrschenden CD4⁺CD8⁺ Phänotyp. Ebenso wenig waren Veränderungen im Verhältnis von αβTCR⁺ und γδTCR⁺ Zellen der IEL nach LPS-Gabe nachweisbar (Tabelle 5).

Demnach war die Aktivierung der IEL nach Septikämie nicht von einer Expansion einer oder mehrerer Subpopulationen begleitet.

4.3.3 Zytokinproduktion

Im zeitlichen Verlauf der Zytotoxizität der IEL zeigte sich der Anstieg der zytolytischen Aktivität erst relativ spät, 12 Stunden nach LPS-Injektion. Um festzustellen, ob es bereits zu einem früheren Zeitpunkt nach LPS-Gabe zu einer Aktivierung der IEL kommt, wurde in den nächsten Experimenten die Zytokinproduktion (IFN- γ) der IEL nach Septikämie mittels ELISA analysiert (Abb. 8).

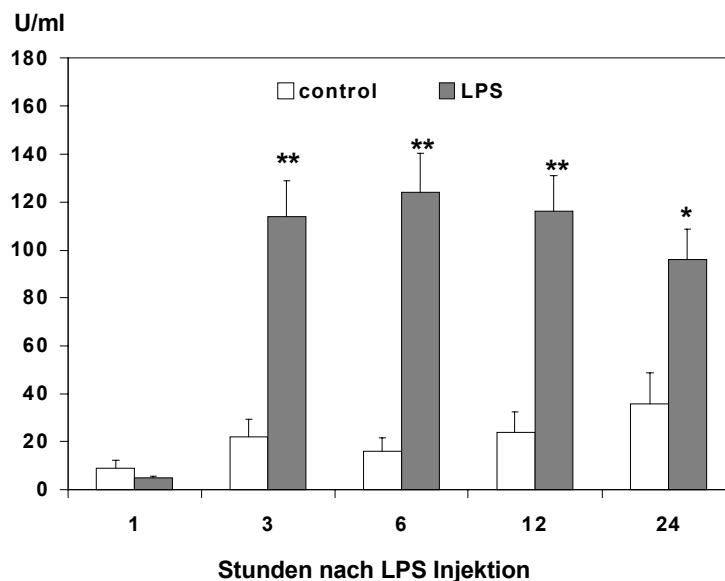


Abbildung 8: IFN- γ Produktion isolierter IEL nach Septikämie

IEL wurden aus der Dünndarmschleimhaut von Kontrolltieren (weiße Säulen) oder von Tieren nach LPS-Injektion (graue Säulen) isoliert und kultiviert wie in Material und Methoden beschrieben. Nach 24 Stunden wurden die Kulturüberstände gesammelt und die IFN- γ Konzentration in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM von drei Experimenten zu jedem Zeitpunkt. * $p < 0,01$ vs. Kontrolle, ** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Eine signifikant ($p < 0.001$) gesteigerte Freisetzung von IFN- γ durch die isolierten IEL konnte bereits drei Stunden nach LPS-Injektion beobachtet werden. Diese gesteigerte Zytokinproduktion der IEL war bis zu 24 Stunden nach Septikämie nachweisbar (Abb. 8). Die Steigerung der Zytokinproduktion der IEL nach Septikämie ging somit der Steigerung der zytolytischen Aktivität der IEL nach Septikämie voraus.

4.3.4 NOS-2 Expression

LPS führt im Darm neben der lymphozytären Aktivierung auch zu einer gesteigerten Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (NOS-2) (100,136). Da IEL, möglicherweise über die Produktion von IFN- γ , Anteil an der Regulation der NOS-2 Expression im Darm und der damit verbundene Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) haben (28), wurde in den nächsten Experimenten die Expression der NOS-2 mRNA im Darm nach Septikämie mittels Northern Blot Analyse bestimmt (Abb.9).

Dabei zeigte sich zunächst eine „konstitutive“ Expression der NOS-2 mRNA im Darm. Diese konstitutive NOS-2 Expression war auf das Ileum beschränkt und war in verschiedenen Mausarten (C57BL/6, DBA/2J) nachweisbar (Daten nicht dargestellt). Unbeeinflusst war die konstitutive NOS-2 Expression der Darmschleimhaut von der Kompetenz des Immunsystems, da sie auch in Nacktmäusen und Tieren mit schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID) nachweisbar war. Ebenso blieb die Besiedelung des Gastrointestinaltraktes oder die Nahrungsaufnahme ohne Einfluß auf die NOS-2 Expression (Daten nicht dargestellt, siehe auch 100).

Nach Endotoxinämie zeigte die Northern Blot Analyse eine im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant vermehrte Expression der NOS-2 mRNA in allen Dünndarmabschnitten bereits 3 Stunden nach LPS-Injektion. (Abb. 9). Die gesteigerte NOS-2 mRNA-Expression war bis zu 24 Stunden nach LPS-Injektion im Darm nachweisbar.

Es bestand jedoch ein erheblicher Unterschied in der NOS-2 mRNA-Expression in den verschiedenen Dünndarmabschnitten. Im Jejunum, dem Darmabschnitt ohne konstitutive NOS-2 Expression, war NOS-2 mRNA-Expression nur während der ersten sechs Stunden nach LPS-Injektion nachweisbar. Im Ileum hingegen, war die gesteigerte NOS-2 Expression bis zu 24 Stunden nach LPS-Injektion zu beobachten.

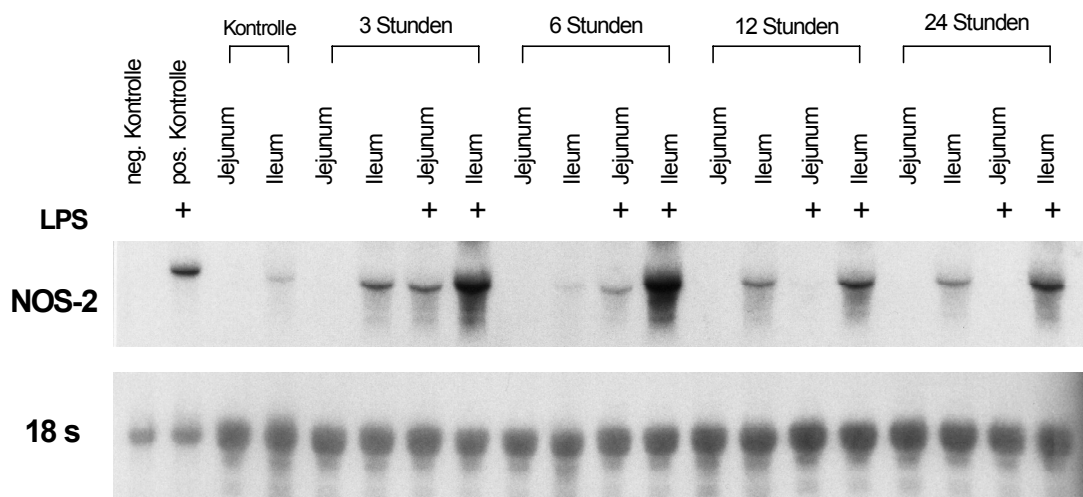


Abbildung 9: NOS-2 mRNA-Expression im Darm nach Septikämie

Gewebeproben wurden aus Jejunum und Ileum 3, 6, 12 und 24 Stunden nach LPS-Injektion oder von Kontrolltieren gewonnen. Als Negativ- und Positiv-Kontrollen wurden unbehandelte, bzw. mit LPS stimulierte RAW 264.7 Zellen verwendet. Die Blots wurden mit einer spezifischen NOS-2 Gensequenz und einer 18S RNA-Gensequenz hybridisiert.

Es konnte somit gezeigt werden, daß es nach Septikämie zu einer sequentiellen Aktivierung verschiedener Abwehrmechanismen in der Darmschleimhaut kommt. Bereits wenige Stunden nach der Gabe von LPS konnte eine verstärkte Produktion von IFN- γ durch IEL nachgewiesen werden. Gleichzeitig kam es, möglicherweise induziert durch IFN- γ , zu einer vermehrten Expression der NOS-2 mRNA in der Dünndarmmukosa. Zwölf Stunden nach Septikämie konnte dann eine Steigerung der zytolytischen Aktivität der isolierten IEL beobachtet werden.

Alle Veränderungen waren in dem gewählten nicht-letalen Sepsismodell reversibel und waren 48 Stunden nach der LPS Gabe nicht mehr nachweisbar.

4.4 IEL BEI MORBUS CROHN

Bei den bislang erörterten Modellen intestinaler Erkrankungen standen entweder die Reaktionen des Immunsystems gegenüber alloenen Antigenen (GvHR und

akute Abstoßung) oder gegenüber bakteriellen Antigenen (Sepsis) im Mittelpunkt der Untersuchungen. Gemeinsam war all diesen Modellen ein zumindest anfangs intaktes Immunsystem. Demgegenüber liegt den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vermutlich eine gestörte Regulation von B-Zell- und T-Zell-Funktion in der Darmschleimhaut zugrunde (71-73,79).

Um mögliche Veränderungen der IEL bei entzündlichen Darmerkrankungen zu analysieren, wurden daher Phänotyp und Funktion der IEL von Patienten mit Morbus Crohn mit Phänotyp und Funktion peripherer Blutlymphozyten derselben Patienten und Lymphozyten gesunder Kontrollpatienten verglichen.

4.4.1 Phänotyp

Bei der phänotypischen Analyse der isolierten IEL mittels Zweifarben-Durchflußzytometrie zeigte sich, daß sowohl IEL von Patienten mit Morbus Crohn, als auch IEL von Kontrollpatienten überwiegend aus CD3⁺ T-Zellen bestanden und keine B-Zellen enthielten (Tabelle 6). Ferner lag in beiden untersuchten Patientengruppen der Anteil an CD3⁻CD16⁺ NK-Zellen unter 2%.

Auffallend war der hohe Anteil (annähernd 20%) sog. „null-cells“ innerhalb der IEL Population (Daten nicht dargestellt). Derartige Zellen, die aufgrund ihrer Größe und Granularität Lymphozyten ähnlich sind, ohne jedoch Lymphozyten- oder NK-Zell-Marker aufzuweisen, sind beschrieben, ihre Funktion ist bislang aber nicht bekannt (27).

Bei den Kontrollpatienten war eine breite Streuung der prozentualen Anteile von CD4⁺ und CD8⁺ IEL zu beobachten, so daß die Mittelwerte der Messungen das tatsächliche Überwiegen der CD8⁺ Zellen bei den einzelnen Patienten nicht überzeugend widerspiegelt.

Im Vergleich zur Kontrollpopulation zeigten IEL von allen Patienten mit Morbus Crohn einen signifikant ($p < 0,04$) gesteigerten Anteil der CD8⁺ Zellen, was sich in der Reduktion der CD4/CD8 Ratio niederschlug (Tabelle 6). Zusätzlich zeigte sich bei Patienten mit Morbus Crohn ein Anstieg der $\gamma\delta$ TCR⁺ Zellen innerhalb der IEL Population. Aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität war diese Zunahme der $\gamma\delta$ ⁺ Zellen im Vergleich zu Kontrollpopulation aber nicht signifikant

unterschiedlich.

Tabelle 6: Phänotyp intestinaler IEL bei Morbus Crohn.

	IEL	
	Kontrolle	Morbus Crohn
CD3 ⁺	62,4 ± 9,4	73,6 ± 11,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺	28,8 ± 7,8	17,5 ± 5,4 [*]
CD3 ⁺ CD8 ⁺	31,7 ± 11,4	59,6 ± 10,8 [*]
CD3 ⁺ αβTCR ⁺	66,5 ± 11,5	67,8 ± 13,2
CD3 ⁺ γδTCR ⁺	3,6 ± 1,6	7,0 ± 4,2
CD20 ⁺	1,1 ± 0,8	0,7 ± 0,4
CD3 ⁻ CD16 ⁺	2,1 ± 0,2	0,8 ± 0,2
CD4/CD8 Ratio	1,0 ± 0,5	0,4 ± 0,2

IEL wurden aus der Darmschleimhaut von Patienten mit Morbus Crohn und von Kontrollpatienten isoliert. Mittels Zweifarbandurchflußzytometrie wurde die Expression verschiedener T-Zell Antigene analysiert und der prozentuale Anteil der verschiedenen Subpopulationen ermittelt. Angegeben sind Mittelwert ± SEM von 6 Patienten je Gruppe. * p<0,04 vs. Kontrolle

Bei der phänotypischen Analyse der peripheren Blutlymphozyten ließen sich keine Unterschiede in der Expression von CD3, CD4, CD8, CD20, αβTCR und γδTCR zwischen Patienten mit Morbus Crohn und Kontrollpatienten feststellen (Tabelle 7).

Die T-Zellen beider Patientengruppen waren überwiegend CD4⁺ und ca. 20% der Lymphozyten wiesen den B-Zell-Marker CD20 auf. In beiden Patientenkollektiven waren die T-Zellen überwiegend αβTCR⁺.

Tabelle 7: Phänotyp peripherer Blutlymphozyten bei Morbus Crohn.

	periphere Blutlymphozyten	
	Kontrolle	Morbus Crohn
CD3 ⁺	72,1 ± 8,3	72,3 ± 9,8
CD3 ⁺ CD4 ⁺	47,5 ± 7,4	43,6 ± 6,2
CD3 ⁺ CD8 ⁺	22,0 ± 5,9	28,3 ± 7,7
CD3 ⁺ αβTCR ⁺	70,4 ± 8,0	70,3 ± 9,9
CD3 ⁺ γδTCR ⁺	2,0 ± 1,2	2,3 ± 1,1
CD20 ⁺	14,7 ± 1,0	14,5 ± 5,5
CD3 ⁻ CD16 ⁺	11,3 ± 5,2	4,3 ± 1,6*
CD4/CD8 Ratio	2,1 ± 0,4	1,8 ± 1,0

Mittels Zweifarbandurchflußzytometrie wurde die Expression verschiedener T-Zell Antigene auf peripheren Blutlymphozyten in heparinisierten Blutproben analysiert und der prozentuale Anteil der verschiedenen Subpopulationen ermittelt. Angegeben sind Mittelwert ± SEM von 6 Patienten je Gruppe. Alle Blutproben von Patienten mit Morbus Crohn und von Kontrollpatienten wurden präoperativ gewonnen. * p<0,01 versus Kontrolle.

Ein signifikanter (p<0,01) Unterschied zwischen Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Crohn bestand im Gehalt an NK-Zellen im peripheren Blut. Im peripheren Blut von Patienten mit Morbus Crohn waren deutlich weniger NK-Zellen als im Blut von Kontrollpatienten nachweisbar. Während bei Kontrollpatienten der Anteil von NK-Zellen zwischen 10,7% und 26,2% schwankte, waren bei Patienten mit Morbus Crohn regelmäßig weniger als 5% der peripheren Blutlymphozyten CD3⁻CD16⁺ NK-Zellen (Tabelle 7).

4.4.2 Zytotoxizität

Der Anstieg von CD8⁺ Zellen in der Darmschleimhaut von Patienten mit Morbus Crohn war begleitet von einem signifikanten Anstieg der unspezifischen zytolytischen Aktivität der isolierten IEL. (Abb. 10 A).

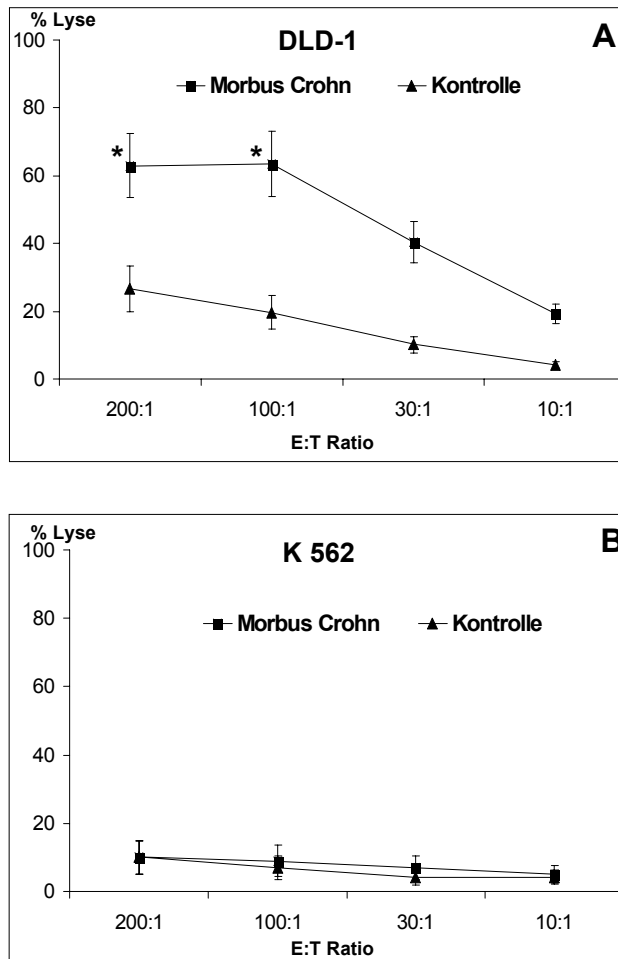


Abbildung 10: Zytolytische Aktivität isolierter IEL bei Morbus Crohn

Die zytolytische Aktivität isolierter IEL von Patienten mit Morbus Crohn (■) oder Kontrollpatienten (▲) wurde gegenüber der humanen Adenokarzinomzelllinie DLD-1 (A) und der NK-sensitiven humanen Leukämiezelllinie K562 (B) in einem ⁵¹[Cr]-Freisetzungsversuch bestimmt. Inkubationsdauer 16 Stunden. * p<0.05 vs. Kontrolle.

In Übereinstimmung mit den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen (40,41) richtete sich diese unspezifische zytolytische Aktivität der IEL, die auch bei Kontrollpatienten nachweisbar war, gegen Zellen epithelialen Ursprungs, wie z.B.

die humanen Colonkarzinomzellen DLD-1 (Abb. 10 A). Die zytolytische Aktivität war nicht MHC restringiert, da DLD-1 Zellen praktisch kein MHC I exprimieren (40). Ebenso wenig handelt es sich bei dieser Aktivität um NK-Aktivität, da weder IEL von Patienten mit Morbus Crohn noch IEL von Kontrollpatienten zytolytische Aktivität gegenüber den NK-sensitiven K562 Zellen entfalteten (Abb. 10 B).

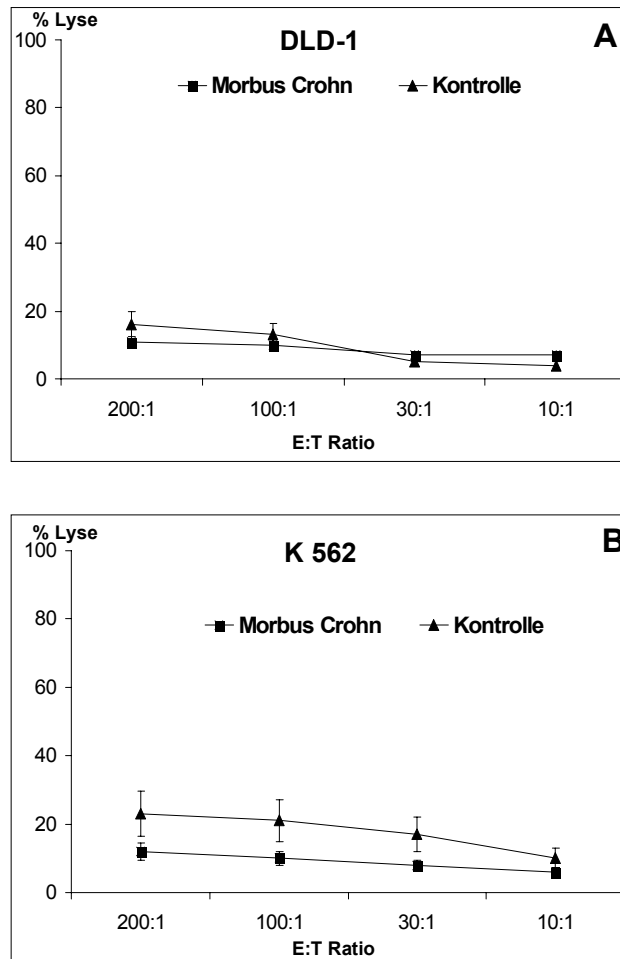


Abbildung 11: Zytolytische Aktivität isolierter Lymphozyten des peripheren Bluts bei Morbus Crohn.

Die zytolytische Aktivität isolierter peripherer Blutlymphozyten von Patienten mit Morbus Crohn (■) oder Kontrollpatienten (▲) wurde gegenüber der humanen Adenokarzinomzelllinie DLD-1 (A) und der NK-sensitiven humanen Leukämiezelllinie K562 (B) in einem ^{51}Cr -Freisetzungsversuch bestimmt. Inkubationsdauer 16 Stunden. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Um festzustellen, ob diese erhöhte zytolytische Aktivität bei Patienten mit Morbus

Crohn auf die intestinalen Lymphozyten beschränkt war, oder sich auch bei peripheren Lymphozyten nachweisen ließ, wurden die zytolytische Aktivität von Lymphozyten des peripheren Bluts gegenüber den gleichen Zielzellen analysiert (Abb. 11).

In beiden Patientenkollektiven war nur eine minimale zytolytische Aktivität gegenüber DLD-1 Zellen nachweisbar (Abb. 11A) und es bestand kein Unterschied zwischen Patienten mit Morbus Crohn und Kontrollpatienten. Im Gegensatz zu IEL wiesen periphere Lymphozyten eine zytolytische Aktivität gegenüber den NK-sensitiven K562 Zellen auf, jedoch war auch hier kein Unterschied zwischen Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Crohn festzustellen (Abb. 11B).

Diese Ergebnisse weisen auf eine selektive Aktivierung intestinaler Lymphozyten bei Patienten mit Morbus Crohn hin. Die lymphozytäre Aktivierung war begleitet von einem Anstieg der CD8⁺ IEL bei Patienten mit Morbus Crohn.

Im Gegensatz zur Aktivierung der intestinalen Lymphozyten war keine funktionelle Aktivierung der peripheren Lymphozyten bei Morbus Crohn zu beobachten. Die Bedeutung der von uns beobachteten Verminderung der NK-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit Morbus Crohn bleibt bislang unklar.

4.5 INTESTINALE ISCHÄMIE/REPERFUSION

Gewebeschädigung aufgrund Ischämie und nachfolgender Reperfusion eines Organs treten bei einer Vielzahl chirurgisch relevanter Krankheitsbilder, wie z.B. Mesenterialinfarkt, inkarzierter Hernie oder Volvulus auf (81,82). Ein etabliertes Modell einer intestinalen Ischämie und Reperfusion (I/R) ist die selektive Unterbrechung des Blutflusses in der Arteria mesenterica superior über einen definierten Zeitraum mit nachfolgender Reperfusion des Darmes (82,83,86,90).

4.5.1 Ausmass der Gewebeschädigung

In dem beschriebenen Modell der selektiven intestinalen Ischämie und Reperfusion wurde zunächst das Ausmaß der intestinalen Schädigung anhand der

Steigerung der Hyaluronsäurekonzentration (122) im Serum bestimmt (Tabelle 8). Da im Rahmen des I/RS eine gleichzeitige Schädigung primär nicht ischämischer Organe, wie z.B. Lunge oder Leber beschrieben ist (83-85), wurde außerdem die hepatische Schädigung nach intestinaler I/R anhand des Anstiegs der Aspartat-amino-transferase (AST) im Serum analysiert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Intestinale und hepatische Schädigung nach intestinaler Ischämie.

	Kontrolle	Ischämie/Reperfusion
Hyaluronsäure (IU/ml)	52 ± 7	349 ± 120*
AST (IU/ml)	80 ± 8	198 ± 12*

Alle Blutproben wurden nach 60 min. intestinaler Ischämie und nachfolgender 60 min. Reperfusionsphase durch aortale Punktion gewonnen. Kontrolltiere wurden nur laparotomiert. Angegeben sind Mittelwert ± SEM von jeweils 5 Ratten je Gruppe. * p<0,01 versus Kontrolle

Wie erwartet zeigte sich nach Ischämie und Reperfusion des Dünndarms nicht nur eine intestinale Schädigung, sichtbar an der signifikanten (p<0,01 versus Kontrolle) Steigerung der Hyaluronsäurekonzentration im Serum, sondern auch ein signifikanter (p<0,01 versus Kontrolle) Anstieg der AST als Hinweis auf eine hepatische Schädigung.

4.5.2 Glutathionhaushalt

Ein entscheidender Faktor bei der Entwicklung von Organschäden nach I/R ist die Freisetzung von reaktiven Radikalen (83,84). Schutz vor dieser oxidativen Radikalwirkung bieten endogene Antioxidantien, wie z.B. das Glutathionsystem, das u.a. als Protonendonator zum Abbau der Radikale beitragen kann (103,137).

Glutathion liegt in der Zelle zu über 99% in der reduzierten Form (GSH) vor. Der Konzentrationsabfall der reduzierten, bzw. der Anstieg der oxidierten Form (GSSG) wird häufig als Ausdruck der verbrauchten antioxidativen Kapazität der Zelle interpretiert. In dem hier verwendeten Modell diente der Abfall der GSH-Konzentration in Darm und Leber als indirektes Maß des oxidativen Streß nach

intestinaler I/R.

Intestinale I/R führte in beiden Organen zu einer Herabsetzung der Gesamt-GSH-Gewebekonzentration (Tabelle 9). Während im Darm dieser GSH-Abfall nur während der ersten Stunde nach I/R zu beobachten war, zeigte sich in der Leber eine deutliche Minderung der GSH-Gewebekonzentration bis zu 4 Stunden nach Reperfusion.

Tabelle 9: GSH-Konzentration in Darm und Leber nach intestinaler I/R

	GSH-Gewebekonzentration (nmol/mg Protein)	
	Dünndarm	Leber
Kontrolle	28,7 ± 4,2	30 ± 8,3
Ischämie, 1 h Reperfusion	20,8 ± 6,1*	21,5 ± 5,5*
Ischämie, 4 h Reperfusion	28 ± 3,8	11,3 ± 2,9**
Ischämie, 24 h Reperfusion	36 ± 4,2	37,4 ± 5,1

Die Gewebeproben wurden nach 60 min. intestinaler Ischämie und der angegebenen nachfolgenden Reperfusionsphase gewonnen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Angegeben sind Mittelwert ± SEM von jeweils 5 Ratten je Gruppe. *p<0,05 versus Kontrolle, **p<0,01 versus Kontrolle

In beiden Organen war 24 Stunden nach I/R keine Veränderung der GSH-Gewebekonzentration mehr nachweisbar. Sowohl im Darm als auch in der Leber war zu diesem Zeitpunkt eine diskrete Steigerung der GSH-Gewebekonzentration über das Ausgangsniveau hinaus zu beobachten. Diese Steigerung der GSH-Gewebekonzentration erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (p>0,05).

4.5.3 Modulation des I/R-Schadens

Die Bedeutung der inflammatorischen Antwort im Ischämie/Reperfusionsschaden (I/RS) ist noch umstritten. Lane et al. berichten über eine Minderung des I/RS

nach Gabe des anti-inflammatorischen Interleukin-10 (98). Um den Effekt anti-inflammatorischer und pro-inflammatorischer Zytokine auf den Gewebeschaden nach intestinaler I/R zu analysieren wurde in den nächsten Versuchen versucht, den I/RS durch Zytokingabe zu modulieren. Dazu wurde den Tieren 5 min. vor Reperfusion entweder das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 (40 µg/kg) oder das pro-inflammatorische Zytokin IL-2 (40 µg/kg) intravenös appliziert. Kontrolltiere erhielten lediglich isotone Kochsalzlösung.

4.5.3.1 AUSMASS DES GEWEBESCHADENS

Die Analyse von AST und Hyaluronsäure im Serum nach der Gabe des anti-inflammatorischen IL-10 deutete überraschenderweise nicht auf eine Minderung, sondern auf eine Zunahme des Gewebeschadens sowohl im Dünndarm als auch in der Leber hin (Tabelle 10).

Tabelle 10: Intestinale und hepatische Schädigung nach Modulation des intestinalen I/RS

	Kontrolle	Ischämie / Reperfusion		
		I/R	I/R + IL-2	I/R + IL-10
Hyaluronsäure (IU/ml)	52 ± 7	349 ± 120*	570 ± 215*	538 ± 110*§
AST (IU/ml)	80 ± 8	198 ± 12*	150 ± 20*§	250 ± 20*§

Alle Blutproben wurden nach 60 min. intestinaler Ischämie und nachfolgender 60 min. Reperfusionsphase durch aortale Punktion gewonnen. Kontrolltiere wurden nur laparotomiert. Angegeben sind Mittelwert ± SEM von jeweils 5 Ratten je Gruppe. * p<0,05 versus Kontrolle, § p>0,05 versus I/R

Im Gegensatz dazu führte die Gabe von IL-2 zu unterschiedlichen Effekten in Darm und Leber. In der Leber war eine Abnahme der Gewebeschädigung zu beobachten, die sich in einer signifikant verringerten AST-Freisetzung niederschlug.

Im Darm war eine derartige Minderung der Gewebeschädigung nach IL-2-Gabe hingegen nicht zu beobachten (Tab. 10). Es kam hier zu einer Zunahme der Hyaluronsäurefreisetzung, die jedoch aufgrund der hohen Variabilität der Meßwerte im Vergleich zu Tieren, die einer alleinigen intestinalen Ischämie unterworfen wurden, keine statistische Signifikanz erreichte.

4.5.3.2 Glutathionhaushalt

Es stellte sich nun die Frage, welche Mechanismen den unterschiedlichen Effekten der Modulation des I/RS durch IL-2 und IL-10 zugrunde liegen. Dazu sollten zunächst die Auswirkungen auf den Glutathionhaushalt untersucht werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: GSH-Konzentration im Dünndarm nach Modulation des I/RS.

	GSH-Gewebekonzentration (nmol/mg Protein)		
	I/R	I/R + IL-2	I/R + IL-10
Kontrolle	28,7 ± 4,2	28,7 ± 4,2	28,7 ± 4,2
Ischämie, 1 h Reperfusion	20,8 ± 6,1	16,8 ± 4,2	8,9 ± 6,2*
Ischämie, 4 h Reperfusion	28 ± 3,8	18,7 ± 4,1	15,9 ± 5,5*
Ischämie, 24 h Reperfusion	36 ± 4,2	19,5 ± 3,9*	18,1 ± 3,6*

Die Gewebeproben wurden nach 60 min. intestinaler Ischämie und der angegebenen nachfolgenden Reperfusionsphase asserviert und bis zur Analyse in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Angegeben sind Mittelwert ± SEM von jeweils 5 Ratten je Gruppe. *p<0,05 versus I/R

Im Dünndarm kam es nach Modulation des I/RS mit IL-10 zu einer im Vergleich zum alleinigen I/R ausgeprägten Senkung der GSH-Gewebekonzentration eine Stunde nach Reperfusion (Tabelle 11). Im Gegensatz dazu war nach IL-2-Gabe kein Unterschied im GSH-Haushalt von Tieren mit alleinigem I/RS und Tieren

nach IL-2-Gabe auszumachen. Sowohl Tiere mit alleinigem I/R als auch Tiere, die mit IL-2 behandelt worden waren, wiesen einen Abfall der GSH-Gewebekonzentration im Dünndarm auf.

Die bei Tieren nach alleiniger I/R beobachtete Normalisierung der GSH-Konzentration innerhalb 24 Stunden nach Reperfusion war nach Modulation des I/R nicht zu beobachten. Sowohl nach IL-10-, als auch nach IL-2-Gabe waren die GSH-Konzentrationen im Darm bis 24 Stunden nach Reperfusion noch deutlich vermindert (Tabelle 11).

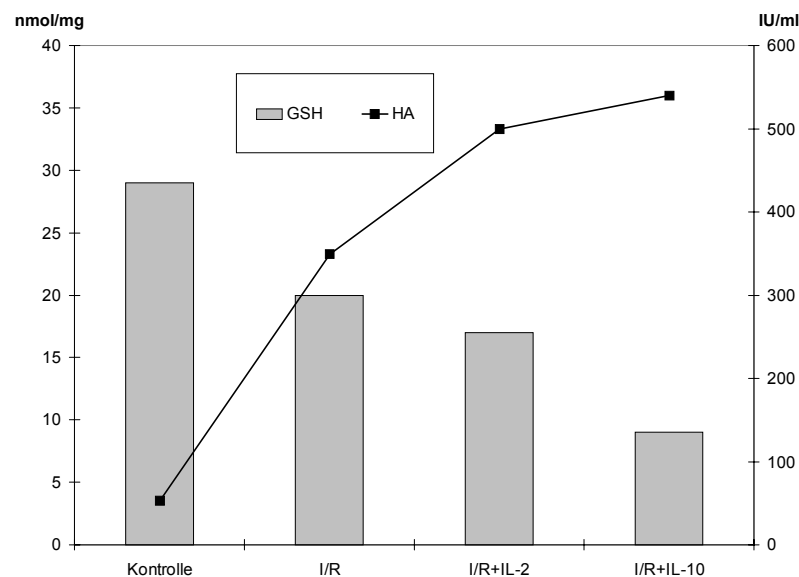


Abbildung 12: Intestinale GSH-Konzentration und Serumkonzentration der Hyaluronsäure nach Modulation des I/R.

Die GSH-Konzentration wurde in Gewebeproben und die HA-Konzentration im Serum bestimmt. Alle Proben wurden nach 60 min. intestinaler Ischämie und nachfolgender 60 min. Reperfusionsphase gewonnen. Kontrolltiere wurden nur laparotomiert. Angegeben sind Mittelwerte von jeweils 5 Ratten je Gruppe.

Das Ausmaß der Gewebeschädigung im Dünndarm nach Modulation des I/R mit schwerster Schädigung nach IL-10-Gabe, korrelierte somit mit dem Abfall der GSH-Konzentration, die nach IL-10-Gabe ebenfalls am deutlichsten ausfiel (Abb. 12).

Im Gegensatz zu den Beobachtungen im Dünndarm, korrelierte der Anstieg der Transaminasen nach intestinaler I/R (Tabelle 10) hingegen nicht mit dem Abfall

der GSH-Konzentration im Lebergewebe (Tabelle 12).

Die Zunahme der hepatischen Schädigung nach IL-10-Gabe war nicht von einem entsprechendem Abfall der GSH-Konzentration begleitet. So war hinsichtlich der GSH-Gewebekonzentrationen in der Leber kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar zwischen Tieren die IL-10 erhalten hatten und Tieren, die einer alleinigen I/R unterworfen worden waren (Tabelle 12).

Die Gabe von IL-2, die zur Minderung des hepatischen Schadens nach I/R geführt hatte, war hingegen von einer deutlichen Senkung der hepatischen GSH-Gewebekonzentration eine Stunde nach Reperfusion begleitet.

Tabelle 12: GSH-Gewebekonzentration in der Leber nach Modulation des I/RS

	GSH-Gewebekonzentration (nmol/mg Protein)		
	I/R	I/R + IL-2	I/R + IL-10
Kontrolle	30 ± 8,3	30 ± 8,3	30 ± 8,3
Ischämie, 1h Reperfusion	21,5 ± 5,5	13,8 ± 4,9	19,1 ± 5,2
Ischämie, 4 h Reperfusion	11,3 ± 2,9	12,7 ± 3,8	13,5 ± 4,6
Ischämie, 24 h Reperfusion	37,4 ± 5,1	39,1 ± 4,7	33,3 ± 6,9

Die Gewebeprobe wurden nach 60 min. intestinaler Ischämie und der angegebenen nachfolgenden Reperusionsphase asserviert und bis zur Analyse in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Angegeben sind Mittelwert ± SEM von jeweils 5 Ratten je Gruppe.

Im Gegensatz zum Dünndarm waren Veränderung der hepatischen GSH-Gewebekonzentration nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar. Sowohl Tiere, die einer alleinigen I/R unterworfen worden waren, als auch Tieren mit IL-2- oder IL-10-Vorbehandlung zeigten 24 Stunden nach Reperfusion wieder normalisierte GSH-Gewebekonzentrationen in der Leber.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Gabe des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 nicht zu einer Minderung, sondern vielmehr zu einer Zunahme des Gewebeschadens in Darm und Leber nach intestinaler I/R führen kann. Hingegen

bewirkte die Modulation des I/RS mit IL-2 eine Minderung zumindest des hepatischen Schadens. Allerdings korrelierte die Minderung des hepatischen Gewebeschadens, sichtbar an einem Abfall der AST-Serumkonzentration nicht mit einem vermindertem Abfall der GSH-Konzentration, d.h. nicht mit einem verminderten oxidativen Streß (Abb.13).

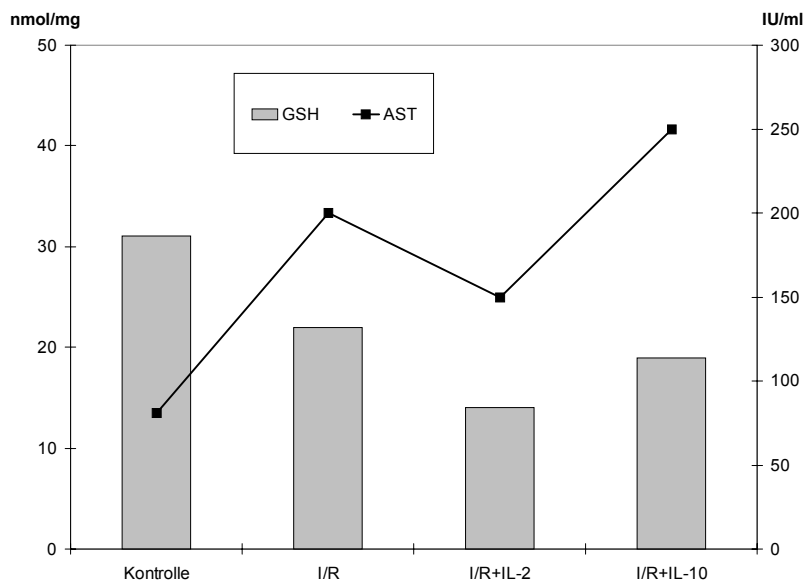


Abbildung 13: AST-Serumkonzentration und hepatische GSH-Konzentration nach Modulation des I/RS.

Die GSH-Konzentration wurde in Gewebeproben und die HA-Konzentration im Serum bestimmt. Alle Proben wurden nach 60 min. intestinaler Ischämie und nachfolgender 60 min. Reperusionsphase gewonnen. Kontrolltiere wurden nur laparotomiert. Angegeben sind Mittelwerte von jeweils 5 Ratten je Gruppe.

4.5.4 Endogene Schutzmechanismen

Zur Klärung der Frage, ob weitere endogene Schutzmechanismen zur Minderung des Gewebeschadens nach Modulation des I/RS beigetragen haben, wurde in den folgenden Experimenten die Expression der potentiell protektiv wirkenden induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (NOS-2) (99-101), sowie der induzierbaren Hämoxygenase-1 (HO-1) analysiert (111,138).

Eine „konstitutive“ Expression der NOS-2 mRNA ließ sich, wie in Kapitel 4.3.4.

beschrieben, im Dünndarm von unbehandelten Kontrolltieren nachweisen. Im Gegensatz dazu war in der Leber der Kontrolltiere keine Expression der NOS-2 mRNA nachweisbar (Abb. 14).

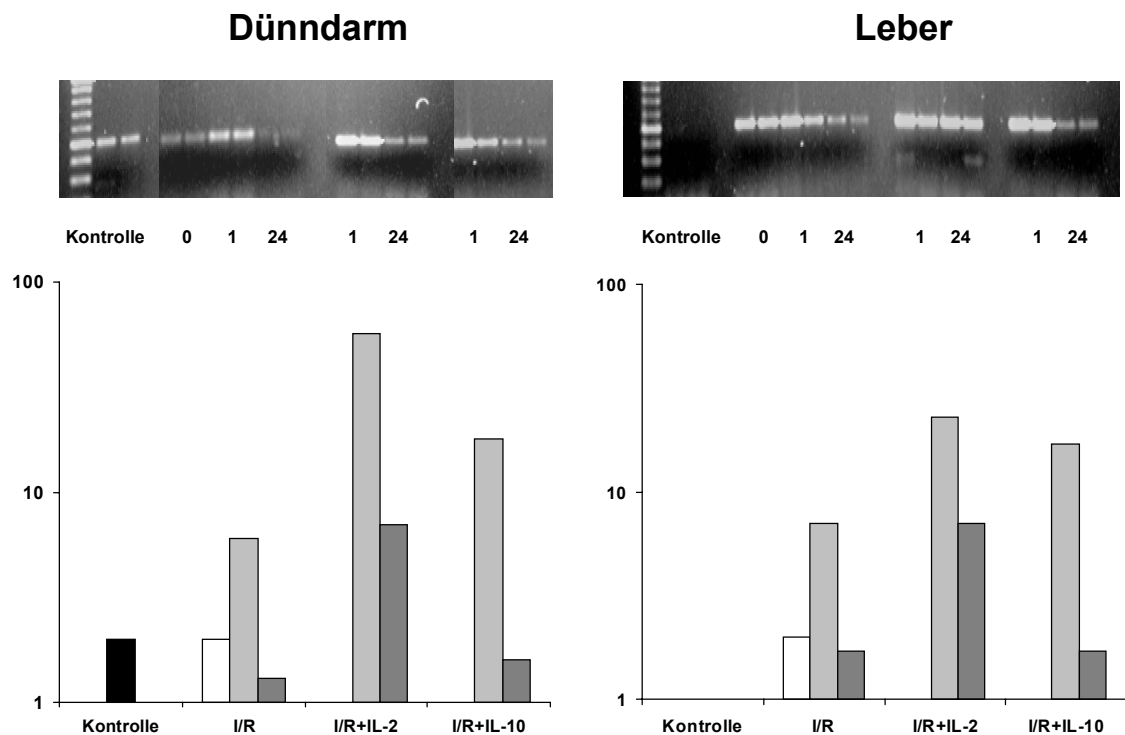


Abbildung 14: NOS-2 mRNA-Expression in Darm und Leber nach intestinaler I/R.

Gewebeproben wurden aus Dünndarm und Leber von jeweils 2 Tieren 1 und 24 Stunden nach intestinaler I/R oder von Kontrolltieren gewonnen. Nach Isolation der Gesamt-RNA erfolgte die PCR-Analyse wie in Material und Methoden beschrieben. Als Negativ- und Positiv-Kontrollen wurde RNA von unbehandelten oder mit LPS stimulierten RAW 264.7 Zellen verwendet. Die quantitative Analyse erfolgte mittels Taq-man PCR.

Intestinale Ischämie ohne nachfolgende Reperfusion führte weder in der Leber noch im Darm zu einer Veränderung der NOS-2 mRNA-Expression. Nach intestinaler Ischämie und nachfolgender Reperfusion kam es sowohl im Dünndarm als auch in der Leber innerhalb einer Stunde nach Reperfusion zu einer Zunahme der NOS-2 mRNA-Expression, die innerhalb von 24 Stunden fast wieder auf das Ausgangsniveau absank (Abb. 14). Diese Unterschiede in der NOS-2 Expression

war in allen untersuchten Tieren nachweisbar. Die Quantifizierung dieser in der RT-PCR sichtbaren unterschiedlichen NOS-2 Expression erfolgte mittels Taq-man PCR. Dabei konnten die in der RT-PCR beobachteten Veränderungen bestätigt werden (Abb. 14)

Die Modulation des I/RS durch Gabe von IL-2 führte in beiden Organen zu einer signifikanten Steigerung der NOS-2 mRNA-Expression, die bis zu 24 Stunden nach Reperfusion anhielt. Im Gegensatz dazu kam es nach Gabe von IL-10 in beiden Organen lediglich eine Stunde nach Reperfusion zu einer Steigerung der NOS-2 mRNA-Expression. 24 Stunden nach IL-10-Gabe zeigte sich die Expression der NOS-2 mRNA in Dünndarm und Leber wieder deutlich vermindert und war nicht mehr von der NOS-2 mRNA-Expression in Dünndarm und Leber nach alleiniger intestinaler I/R zu unterscheiden.

Dieser Verlauf der NOS-2 mRNA-Expression in beiden Organen nach I/R spiegelte sich auch in einer entsprechenden Steigerung der NOS-2 Proteinexpression wieder (Daten nicht dargestellt)..

Der alleinige Nachweis von NOS-2 mRNA oder NOS-2 Protein erlaubt jedoch keine Schlußfolgerungen bezüglich der biologisch entscheidenden Aktivität des Enzyms. Daher wurde in den nächsten Experimenten die Konzentration der stabilen NO-Derivate Nitrit und Nitrat $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ im Serum bestimmt, durch die auf eine Veränderung der NOS-Enzymaktivität rückgeschlossen werden kann (Tabelle 13) (139).

Die Serumkonzentration von Nitrit und Nitrat lag bei unbehandelten Kontrolltieren regelmäßig unter 20 $\mu\text{mol/l}$ (Tabelle 13).

Intestinale I/R bewirkte 4 Stunden nach Reperfusion eine deutliche Steigerung der Serumkonzentration der NO-Derivate (Tabelle 13). Die Vorbehandlung der Tiere mit IL-2 vor Reperfusion führte zu einer weiteren signifikanten Steigerung der Nitrit/Nitrat-Serumkonzentration.

Diese Ergebnisse deuten auf eine gesteigerte Freisetzung reaktiver Stickstoffradikale nach I/R, möglicherweise als Folge einer gesteigert NOS-2 Aktivität hin. Diese gesteigerte NOS-2 Aktivität könnte Ursache der positiven Wirkung der IL-2-Vorbehandlung auf den I/R Schaden sein.

Tabelle 13: Serumkonzentration der NO-Derivate $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ nach intestinaler I/R

$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ($\mu\text{mol/l}$)	Ischämie / Reperfusion		
	I/R	I/R + IL-2	I/R + IL-10
Kontrolle	$13,8 \pm 2,1$	$13,8 \pm 2,1$	$13,8 \pm 2,1$
Ischämie	$21,2 \pm 4,3$	$21,2 \pm 4,3$	$21,2 \pm 4,3$
I/R 1 h	$21,0 \pm 8,5$	$28,4 \pm 10,8$	$27,5 \pm 8,5$
I/R 4 h	$46,4 \pm 8,5$	$57,8 \pm 5,4^*$	$33,1 \pm 5,4^*$
I/R 24 h	$22,4 \pm 7,4$	$26,0 \pm 18,1$	$27,4 \pm 12,3$

Die Blutproben wurden nach 60 min. intestinaler Ischämie oder nach Ischämie und nachfolgender Reperfusionphase durch aortale Punktion gewonnen. Kontrolltiere wurden nur laparotomiert. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM von jeweils 5 Ratten je Gruppe. * $p < 0,05$ versus I/R

Im Gegensatz dazu bewirkte die Vorbehandlung mit IL-10 keine Steigerung der Nitrit/Nitratkonzentration im Serum. Im Vergleich zu Tieren mit alleiniger I/R kam es nach IL-10-Gabe sogar zu einer Senkung der $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ Serumkonzentration. Der fehlende Anstieg der NO-Derivate im Serum nach Modulation des I/R mit IL-10 deutet wiederum auf eine verminderte NOS-2 Aktivität als Ursache der negativen Wirkung von IL-2 auf den I/RS hin.

In allen Gruppen zeigte sich innerhalb von 24 Stunden nach Reperfusion eine Normalisierung der Nitrit/Nitratkonzentration im Serum. Zu diesem Zeitpunkt entsprachen die Nitrit/Nitratkonzentration im Serum aller Tiere wieder denen der Kontrolltiere.

Ein weiterer möglicher endogener Schutzmechanismus, der auch durch NO induziert werden kann, ist die Hämoxxygenase-1 (HO-1 oder auch HSP32) (85,113), ein Enzym, dem eine ausgeprägte anti-oxidative und damit zytoprotektive Wirkung zugeschrieben wird (85,107-109).

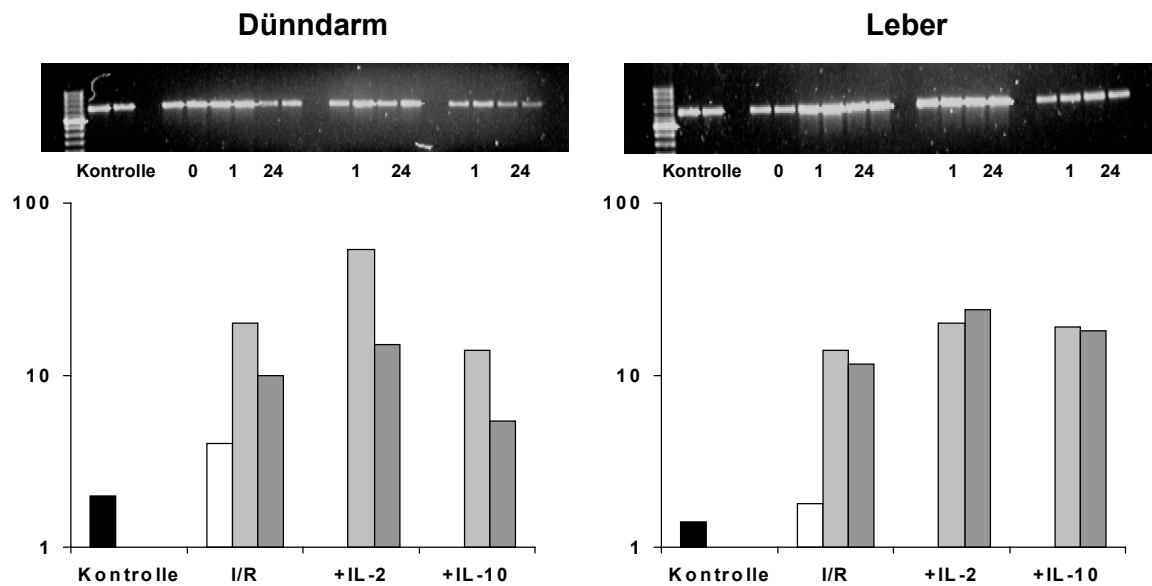


Abbildung 15: HO-1 mRNA-Expression in Darm und Leber nach intestinaler I/R

Gewebeproben wurden aus Dünndarm und Leber von jeweils 2 Tieren 1 und 24 Stunden nach intestinaler I/R oder von Kontrolltieren gewonnen. Nach Isolation der Gesamt-RNA erfolgte die PCR-Analyse wie in Material und Methoden beschrieben. Als Negativ- und Positiv-Kontrollen wurde RNA von unbehandelten oder mit LPS stimulierten RAW 264.7 Zellen verwendet. Die quantitative Analyse erfolgte mittels Taq-man PCR.

In den folgenden Experimenten wurde daher die Expression der HO-1 in Darm und Leber nach intestinaler I/R und nach Modulation des I/RS analysiert (Abb. 15).

Dabei zeigte sich, daß die alleinige Ischämie ohne Reperfusion zwar im Darm, nicht aber in der Leber zu einer diskreten Steigerung der HO-1 mRNA-Expression führte. Die nachfolgenden Reperfusion bewirkte hingegen in beiden Organen eine deutliche Steigerung der HO-1 mRNA Expression, die bis 24 Stunden nach Reperfusion anhielt (Abb. 15).

Da die Veränderungen der HO-1 Expression in der RT-PCR nur gering ausgeprägt waren, wurde zur genaueren Quantifizierung wiederum eine real-time PCR durchgeführt. Mit dieser Methode konnten die in der RT-PCR beobachteten

Veränderungen der HO-1 Expression bestätigt werden.

Nach Modulation des I/RS mit IL-2 und IL-10 zeigten sich erhebliche Unterschiede zwischen Darm und Leber. Während in der Leber weder IL-2 noch IL-10 zu einer signifikanten Veränderung der HO-1 Expression führte, war im Darm nach IL-2 Gabe eine Zunahme der HO-1 mRNA-Expression in der ersten Stunde nach Reperfusion zu beobachten. Dagegen führte IL-10 im Darm im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu einer geringer und kürzer ausgeprägten Steigerung der HO-1 mRNA-Expression.

5 DISKUSSION

Die Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes hat mehrere sich widersprechende Funktionen zu erfüllen: Einerseits muß sie eine Barriere gegenüber potentiell pathogenen Mikroorganismen bilden, andererseits die Resorption von Nahrungsbestandteilen ermöglichen und gleichzeitig die Immunantwort gegenüber den Fremdanitigenen aus der Nahrung unterdrücken (orale Toleranz) (10,29,62-64).

Störungen dieses fragilen Gleichgewichts kennzeichnen eine Vielzahl von Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, unabhängig von der Genese der Erkrankung. Dabei finden sich Infektionen aufgrund verminderter Barrierefunktion oder Malabsorption und Diarrhoe als Zeichen gestörter Resorptionsvorgänge.

Eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des komplexen Systems von intestinaler Barriere und oraler Toleranz spielen die intraepithelialen Lymphozyten (IEL). Sie bekämpfen vermutlich als „first line of defense“ Infektionen, unterdrücken aber auch als Suppressorzellen eine überschießende Immunantwort gegenüber Antigenen aus der Nahrung (2,8,13,27,29,34,37,41). Wenig war bislang jedoch über die Funktion dieser Zellen bei verschiedenen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher Phänotyp und Funktion der IEL nach Transplantation, bei Infektionen und bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen charakterisiert. Dazu wurden die akute Abstoßung nach Dünndarmtransplantation bei Ratten und die akute Graft versus Host Reaktion in der Maus als spiegelbildliche Modelle allogener, bzw. semi-allogener Transplantation gewählt. Als Modell einer Infektion mit gram-negativen Erregern diente die LPS-induzierte Sepsis in Mäusen. Die Veränderungen der IEL bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden hingegen nicht im Tiermodell untersucht, sondern im Gewebe von Patienten mit Morbus Crohn analysiert.

5.1 DÜNNDARMTRANSPLANTATION UND GRAFT VERSUS HOST REAKTION

Nach der Transplantation von allogenen Organen kommt es regelhaft zur Infiltration des transplantierten Organs mit Lymphozyten der Empfänger (140).

Gleichzeitig wandern Spenderlymphozyten aus dem Transplantat in den Empfänger. Während nach Dünndarmtransplantation der Nachweis von Spenderlymphozyten im Empfänger als Zeichen der Organakzeptanz gewertet wird (141), ist die Bedeutung der Infiltration des Transplantats mit Empfängerzellen umstritten. Einerseits gilt der Nachweis von infiltrierenden Empfängerzellen im transplantierten Organ als pathognomonisch für eine akute Abstoßung (45). Andererseits kommt es nach Dünndarmtransplantation auch ohne Abstoßung bereits im Rahmen der physiologischen Lymphozytenzirkulation zur Migration von Empfängerlymphozyten in die Lamina propria und Submukosa des Transplantats (46,142). Diese physiologische Migration schränkt die diagnostische Wertigkeit des Nachweises von Empfängerlymphozyten im Transplantat bezüglich akuter Abstoßung erheblich ein. Inwieweit diese Migration auch das intraepitheliale Kompartiment einschließt, oder ob die mukosale Infiltration als Zeichen der Abstoßung gewertet werden muß, war bislang unklar.

In der vorliegenden Arbeit konnten nach allogener Dünndarmtransplantation reife Lymphozyten des Empfängers in der Darmschleimhaut des Transplantats nachgewiesen werden. Diese infiltrierenden Empfängerzellen waren sowohl bei akuter Abstoßung nachweisbar, als auch bei Tieren, bei denen die Abstoßung durch Immunsuppression mit Tacrolimus verhindert worden war. Bei Tieren mit akuter Abstoßung war der Anteil der Empfängerlymphozyten im Epithel allerdings signifikant größer als bei immunsupprimierten Tieren. Dies zeigt, daß die Migration von Empfängerlymphozyten in die Darmschleimhaut nach Dünndarmtransplantation regelhaft auch ohne akute Abstoßungsreaktion auftritt. Der alleinige Nachweis von Empfängerzellen in der Darmschleimhaut scheint daher zur Diagnostik einer akuten Abstoßung nicht geeignet.

Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zu den Berichten von Grover et al. (42,143) und Oberhuber et al. (44), die eine Infiltration der Darmschleimhaut mit Lymphozyten des Empfängers nur während akuter Abstoßung nach Dünndarmtransplantation nachweisen konnten und diese Infiltration daher als beweisend für eine akute Abstoßung ansahen.

Eine Erklärung für die einander widersprechenden Ergebnisse liegt möglicherweise in den unterschiedlichen Modellen, die verwendet wurden. In der

vorliegenden Arbeit wurde eine orthotope Dünndarmtransplantation in der vollallogenen Stammkombination ACI auf Lewis durchgeführt und die akute Abstoßung wurde durch hohe Dosen von Tacrolimus verhindert. Oberhuber und seine Mitarbeiter (44) verwendeten hingegen ein Modell der akzessorischen Dünndarmtransplantation in einer anderen Stammkombination (Lewis auf Braun-Norway). Ein weiterer Unterschied bestand hinsichtlich der Immunsuppression. Oberhuber verabreichte Cyclosporin A, ein weniger potentes Immunsuppressivum als das von uns verwendete Tacrolimus (115,116,144). Grover und seine Mitarbeiter (42,143) unternahmen ihre Untersuchungen wiederum in einem Modell der heterotopen Dünndarmtransplantation in einer semi-allogenen Stammkombination („parent into F1“) und verzichteten auf eine immunsuppressive Therapie, da in dieser Stammkombination keine akute Abstoßung auftritt. Allerdings entwickeln die Tiere in diesem Modell eine Graft-versus-Host-Reaktion, deren mögliche Wirkung auf die Infiltration der Mukosa mit Empfängerzellen unberücksichtigt blieb.

Die infiltrierenden Zellen in der Darmschleimhaut nach den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten allogenen Dünndarmtransplantation wiesen einen Phänotyp auf, der identisch war mit dem von IEL von unbehandelten Kontrolltieren. Die typische Verteilung der Subtypen mit einem Übergewicht von $CD4^+CD8^-$, einem erheblichen Anteil von $\alpha\beta TCR^+$ Zellen und dem Fehlen von B-Zellen war sowohl in Tieren mit akuter Abstoßung, als auch in den immunsupprimierten Tieren nachweisbar. Es ist daher anzunehmen, daß die infiltrierenden Lymphozyten in der Darmschleimhaut aus dem peripheren Immunsystem des Empfängers stammen, dessen Lymphozyten sich phänotypisch erheblich von IEL unterscheiden: Sie enthalten sowohl B- als auch T-Zellen mit einem überwiegendem $CD4^+CD8^-$ Phänotyp (3).

Die Ursache dieser Selektion infiltrierender Zellen, die einen „IEL-Phänotyp“ aufwiesen, bleibt unklar. Es ist anzunehmen, daß die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den infiltrierenden Zellen im Rahmen dieses Selektionsprozeß von Bedeutung ist. Unterstützung für diese Hypothese kommt von den Beobachtungen von Chao et al. (145) und Eiras et al. (146), die erhebliche Unterschiede zwischen IEL und peripheren Lymphozyten hinsichtlich der Expression von Adhäsionsmolekülen beschrieben. Ungeklärt bleibt allerdings,

ob in Abhängigkeit von der Expression der Adhäsionsmoleküle nur bestimmte Lymphozyten in die Darmmukosa migrieren konnten, oder ob das intestinale Milieu das Expressionmuster der Adhäsionsmoleküle auf den infiltrierenden Zellen derart veränderte, daß nur die beschriebenen Subpopulationen in der Darmmukosa verblieben (147). Ohne Einfluß blieben in jedem Fall sowohl die lymphozytäre Aktivierung im Rahmen der akuten Abstoßung als auch die Immunsuppression mit Tacrolimus nach Dünndarmtransplantation. In beiden Fällen war der Phänotyp der infiltrierenden Zellen in der Transplantatmukosa identisch, unterschiedlich war lediglich das Ausmaß der lymphozytären Infiltration.

Eine entsprechende Infiltration der Dünndarmmukosa durch Lymphozyten mit einem „IEL-Phänotyp“ war auch nach Graft-versus-Host-Reaktion, dem immunologischen Spiegelbild der akuten Abstoßung, zu beobachten. Die Infiltration der Darmschleimhaut bei GvHR durch überwiegend CD8⁺ Zellen ist bereits mehrfach beschrieben worden (53-56,58). In dem verwendeten Maus-Modell der akuten Graft versus Host Reaktion zeigte sich jedoch nicht nur ein Übergewicht der CD8⁺ Zellen, sondern eine Übereinstimmung der infiltrierenden Zellen und IEL hinsichtlich der Expression von CD4, CD8, $\alpha\beta$ TCR und $\gamma\delta$ TCR, sowie in der Expression der verschiedenen V β Subtypen. Interessant ist in dem Zusammenhang wiederum der Unterschied zwischen der ursprünglich injizierten Zellpopulation und den Lymphozyten, die die Darmschleimhaut infiltrierten. Während die injizierten Zellen sowohl B- als auch T-Zellen und Makrophagen enthielten (14,117), bestanden die Lymphozyten in der Darmschleimhaut fast ausschließlich aus T-Zellen mit der für IEL typischen Verteilung der Subpopulationen. Unsere Beobachtung, daß die infiltrierenden Zellen in der Milz derselben Tiere sowohl T- als auch B-Zellen enthielten, und sich kaum von der injizierten Zellpopulation unterschieden (14), weist nochmals auf die selektive Infiltration der Darmschleimhaut mit reifen Lymphozyten eines „IEL-typischen“ Phänotyps hin.

Die Mechanismen, die dieser selektiven Infiltration nach Dünndarmtransplantation oder GvHR zugrunde liegen, sind noch wenig verstanden. Ein möglicher Mechanismus besteht in der beschränkten Zugänglichkeit des Epithels für bestimmte Lymphozytensubpopulationen. So postulierte Poussier (6), daß das intraepitheliale Kompartiment für reife Lymphozyten kaum zugänglich sei und

lediglich unreife Vorläuferzellen der IEL in die Darmschleimhaut migrieren könnten. Gleichzeitig konnten Sydora et al. (148) jedoch zeigen, daß reife IEL nach Transplantation in SCID Mäuse wieder vornehmlich in der Darmschleimhaut nachweisbar waren, also als reife Zellen in das intraepitheliale Kompartiment gewandert waren. Camerini et al. (149) konnten schließlich durch Transplantation von reifen thymusabhängig entwickelten T-Zellen eine Rekonstitution der intestinalen Lymphozyten in SCID Mäusen erreichen. Diese Beobachtungen machen es wahrscheinlich, daß reife Lymphozyten im Rahmen der physiologischen Lymphozytenmigration in die Darmmukosa einwandern (20). Dies bedeutet auch, daß die Infiltration der Darmschleimhaut nach Dünndarmtransplantation nicht per se als pathologisch anzusehen ist. Auch der beobachtete Unterschied im Ausmaß der Infiltration zwischen Tieren mit akuter Abstoßung und immunsupprimierten Tieren läßt keine sicheren Schlüsse zu, da bislang wenig über das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Lymphozytenmigration bei gesunden Tieren bekannt ist. So bleibt offen, ob die von uns beobachteten Unterschiede hinsichtlich der lymphozytären Infiltration nach Dünndarmtransplantation auf einer Hemmung der Infiltration durch die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus oder einer Beschleunigung durch die akute Abstoßung beruhen.

Bei akuter GvHR bestanden die infiltrierenden Lymphozyten in der Darmschleimhaut in den ersten Wochen nach Induktion der GvHR zunächst aus überwiegend $\alpha\beta\text{TCR}^+\text{CD8}\alpha\beta^+$ Zellen. Erst nach mehreren Monaten wiesen die infiltrierenden Zellen in der Darmschleimhaut einen für IEL typischen Anteil von über 30% $\gamma\delta\text{TCR}^+$ Lymphozyten auf. In diesem Zeitraum veränderte sich auch das Verhältnis der $\text{CD8}\alpha\alpha^+$ und $\text{CD8}\alpha\beta^+$ Lymphozyten. Waren es anfänglich fast ausschließlich $\text{CD8}\alpha\beta^+$ T-Zellen, die die Dünndarmschleimhaut infiltrierten, so wiesen zwei Monate nach GvHR Induktion mehr als 30% der CD8^+ T-Zellen den für IEL typischen $\text{CD8}\alpha\alpha$ Rezeptor auf.

Wie läßt sich diese kontinuierliche Zunahme an phänotypischer Übereinstimmung zwischen infiltrierenden und intraepithelialen Lymphozyten erklären? Der anfänglich geringe Anteil von $\gamma\delta\text{TCR}^+$ Zellen beruhte vermutlich auf der geringen Zahl dieser Zellen im Inokulum (14). Die Expansion dieser Zellen könnte zur

langsamen Zunahme der $\gamma\delta\text{TCR}^+$ Zellen im Verlauf der Erkrankung geführt haben (50). Denkbar ist aber auch die Migration unreifer Zellen aus dem Inokulum in die Darmschleimhaut und ihre thymusunabhängig Reifung im Epithel der Darmschleimhaut (150). Eine weitere Erklärung, insbesondere auch für die Expression des für periphere Lymphozyten ungewöhnlichen homodimeren $\text{CD8}\alpha\alpha$ Rezeptor (17,18) auf den infiltrierenden Lymphozyten, beruht auf der Vorstellung, daß reife T-Zellen nach Transplantation und Migration in das Dünndarmepithel diesen für IEL typischen Rezeptor exprimieren (147). So konnten Morrissey et al. (147) zeigen, daß reife CD4^+ Lymphozyten nach Transplantation in SCID Mäuse in den Dünndarm migrieren und erst dort den homodimeren $\text{CD8}\alpha\alpha$ Rezeptor exprimieren.

Zusammengefaßt stellten wir fest: Es kommt nach Dünndarmtransplantation zu einer Infiltration der Darmschleimhaut mit Empfängerzellen und nach GvHR zu einer Infiltration der Darmschleimhaut mit Spenderzellen. Dabei weisen die infiltrierenden Zellen unabhängig von Immunsuppression, akuter Abstoßung oder Schweregrad der GvHR (Daten nicht gezeigt) einen Phänotyp auf, der indentisch ist mit dem nativer IEL. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer zunehmenden phänotypischen Übereinstimmung von infiltrierenden Lymphozyten und IEL, so daß mehrere Monate nach Erkrankungsbeginn auch Subpopulationen der infiltrierenden Zellen nachgewiesen werden können, die typisch für IEL sind, aber weder im peripheren Immunsystem des Empfängers noch im Inokulum vorkommen. Es kommt also nach Dünndarmtransplantation oder GvHR zu einer selektiven Migration von „IEL-ähnlichen“ Lymphozyten in die Darmschleimhaut.

Sowohl bei akuter Abstoßung nach Dünndarmtransplantation als auch bei akuter intestinaler GvHR tritt eine zunehmende Gewebeerstörung im Gastrointestinaltrakt auf, für die infiltrierende spezifische zytotoxische T-Zellen verantwortlich gemacht werden (47,53,54). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte bei akuter Abstoßung nach allogener Dünndarmtransplantation eine gesteigerte spezifische zytolytische Aktivität isolierter IEL gegenüber Spenderantigenen nachgewiesen werden.

Die Unterdrückung der Abstoßungsreaktion durch immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus führte zu einer Minderung der spezifischen anti-Spender-Aktivität der

isolierten IEL. Die Minderung der spezifischen zytolytischen Aktivität war von einer Minderung des Gewebeschadens begleitet. Dies unterstützt die Vorstellung, daß spezifische anti-Spender T-Zellen an der Gewebeerstörung bei akuter Abstoßung beteiligt sind (47).

Eine Erklärung für diese Herabsetzung der anti-Spender-Aktivität unter der Behandlung mit Tacrolimus beruht auf der hemmenden Wirkung von Tacrolimus auf die Entwicklung von spezifischen anti-Spender CTL nach Transplantation (151,152). Die Behandlung mit Tacrolimus führte aber gleichzeitig auch zu einem verminderten Anteil von Empfängerzellen in der Darmschleimhaut. Dies resultierte wiederum in einer geringeren Anzahl von spender-spezifischen T-Zellen in der Transplantatmukosa. Diese Reduktion hat möglicherweise auch zur Reduktion der spezifischen anti-Spender-Aktivität in den mit Tacrolimus behandelten Tieren beigetragen.

Neben der spezifischen anti-Spender-Aktivität der isolierten IEL war bei den Tieren nach Dünndarmtransplantation ebenfalls eine anti-Empfänger-Aktivität der IEL nachweisbar. Dies war überraschend, da in der hier verwendeten Stammkombination der klinische Verlauf üblicherweise von der akuten Abstoßung dominiert wird. (133,142). Unsere Beobachtungen weisen aber auf eine zusätzliche Graft-versus-Host-Reaktion in den transplantierten Tieren hin. Diese, wenngleich schwach ausgeprägte, GvHR blieb hinter der deutlich ausgeprägteren Abstoßungsreaktion verborgen, hat aber möglicherweise auch zur Gewebeerstörung beigetragen.

Ebenso wie die anti-Spender-Aktivität der akuten Abstoßung konnte die anti-Empfänger-Aktivität durch Gabe von Tacrolimus vermindert werden. Allerdings ließ sich hier der immunsuppressive Effekt nicht auf eine Verminderung der spezifischen anti-Empfänger T-Zellen in der Transplantatmukosa zurückführen (Daten nicht dargestellt).

Eine spezifische zytolytische Aktivität der isolierten IEL konnte auch bei akuter GvHR im Mausmodell nachgewiesen werden. Diese spezifische anti-Empfänger-Aktivität war nur in der zweiten und dritten Woche nach GvHR Induktion nachweisbar. Da der Prozeß der Gewebeerstörung bei akuter GvHR allerdings nicht auf diesen Zeitraum beschränkt ist (54-56,58), müssen noch weitere

Faktoren zum Gewebeschaden beigetragen haben. Einer dieser Faktoren könnte die unspezifische zytolytische Aktivität der IEL sein, die nach GvHR-Induktion deutlich gesteigert war. Interessanterweise war diese unspezifische zytolytische Aktivität bereits in der ersten Woche nach GvHR-Induktion gesteigert, zu einem Zeitpunkt, als die infiltrierenden Spenderzellen weniger als 2% der gesamten IEL ausmachten. Dies deutet darauf hin, daß die Steigerung der unspezifischen zytolytischen Aktivität nicht allein durch die infiltrierenden Spenderzellen vermittelt wurde. Vielmehr lässt sich vermuten, daß es auch zu einer Aktivierung der Empfängerzellen in der Darmschleimhaut während akuter GvHR kommt. Diese Aktivierung beruht möglicherweise auf einer verstärkten MHC II - Expression der Epithelzellen der Darmschleimhaut (153) oder auch auf einer verstärkten Zytokinproduktion der infiltrierenden Spenderzellen (154). Die Auswirkungen dieser gesteigerten unspezifischen Aktivität bleiben allerdings unklar. So bleibt zu beweisen, ob die zytolytische Aktivität tatsächlich zu einer Zunahme des Gewebeschadens bei GvHR geführt hat, oder ob die Aktivitätssteigerung nicht vielmehr Ausdruck der Überwachungsfunktion der IEL (10,27,155) und damit notwendiger Bestandteil bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Barrierefunktion war.

Die vorgestellten Daten zeigen, daß es während akuter Abstoßung und akuter GvHR zur Induktion einer spezifischen zytolytischen Aktivität isolierter IEL kommt, die gegen Spenderantigene (akute Abstoßung), bzw. Empfängerantigene (GvHR) gerichtet ist. Während nach Dünndarmtransplantation keine Veränderung der unspezifischen Aktivität isolierter IEL zu beobachten war, kommt es bei akuter GvHR zu einer andauernden Steigerung der unspezifischen CD3-vermittelten zytolytischen Aktivität der IEL. Die Bedeutung dieser gesteigerten zytolytischen Aktivität bleibt indessen unklar. Sowohl ein negativer Effekt mit Steigerung des Gewebeschadens, als auch ein positiver Effekt im Hinblick auf die mukosale Barrierefunktion sind denkbar.

5.2 LPS-INDUZIERTER SEPSIS

Die Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes ist die größte potentielle Eintrittspforte des Organismus für pathogene Mikroorganismen (62). Besonders der Eintritt

gram-negativer Keime ist bedeutsam für die Pathogenese generalisierter Krankheitszustände (59). Als Modell einer derartigen gram-negativen Infektion diente die intravenöse Gabe von LPS, das in der verwendeten Dosis bei Mäusen zu einem nicht-letalen septischen Krankheitsbild führt (119). Funktionsveränderung der IEL, denen als „first line of defense“ eine entscheidende Rolle bei der Infektionsabwehr im Gastrointestinaltrakt zugeschrieben wird (10,26,32,62,63,155), sollten in diesem Modell charakterisiert werden.

In Übereinstimmung mit der Hypothese einer Abwehrfunktion der IEL gegenüber Infektionen im Gastrointestinaltrakt konnte in der vorliegenden Arbeit eine Aktivitätszunahme der IEL im Rahmen der LPS-induzierten Sepsis beobachtet werden. Dabei kam es sowohl zu einer Steigerung der zytolytischen als auch der proliferativen Aktivität der IEL (Daten nicht dargestellt) und zu einer Zunahme der Zytokinproduktion der isolierten Lymphozyten.

Die Steigerung der unspezifischen zytolytischen Aktivität der IEL war 12-24 Stunden nach Endotoxinämie zu beobachten, während 6 und 48 Stunden nach Endotoxinämie keine signifikanten Veränderungen gegenüber Kontrolltieren nachweisbar waren. Es bleibt spekulativ, gegen welches Ziel sich die unspezifische zytolytische Aktivität der IEL richtete, da IEL aber auf Streßproteine sowie auf bakterielle und virale Antigene reagieren können (26,34-39), liegt die Vermutung nahe, daß IEL bei Septikämie zur Beseitigung alterierter oder infizierter Epithelzellen beitragen.

Da zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach Endotoxinämie eine Veränderung des Phänotyps der IEL zu beobachten war, führen wir die gesteigerte zytolytische Aktivität der IEL auf eine funktionelle Aktivierung und nicht auf die Expansion einer Subpopulation zurück.

Die von uns beobachtete Konstanz des Phänotyps der IEL bei Sepsis stimmt mit den Beobachtungen von Yanamoto et al. (26) überein. Yanamoto und seine Mitarbeiter untersuchten den Phänotyp von murinen IEL nach einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* und konnten dabei keine Veränderungen im relativen Verhältnis der CD4⁺, CD8⁺, $\alpha\beta$ TCR⁺ or $\gamma\delta$ TCR⁺ IEL feststellen. Demgegenüber beschreiben Österberg et al. (68) eine Reduktion von CD8⁺ T-Zellen in der

Darmschleimhaut septischer Ratten. Speziesunterschiede (Ratte/Maus) sowie die unterschiedlichen Sepsismodelle sind als Erklärung für die beobachteten Unterschiede denkbar. Die von Österberg et al. verwendete Ligatur des Zökums mit anschließender Colonperforation führt zu einer ausgedehnten letztlich letalen Peritonitis aufgrund einer schweren Mischinfektion durch die intestinale Flora (68). Demgegenüber führt die von uns verwendete Injektion von LPS zu einem nicht-letalem septischen Krankheitsbild ohne Peritonitis (119). Die Arbeitsgruppe von Yanamoto arbeitete wiederum in einem Modell einer Monoinfektion mit einem gram-positiven Erreger (26).

Eine andere Erklärung für phänotypische Veränderung der IEL, wie sie bei Sepsis und anderen Erkrankungen wie z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (16,79) oder Ischämie-Reperfusionsschaden (156) beobachtet wurden, basiert auf der Beobachtung, daß die phänotypischen Veränderungen gewöhnlich nur auftreten, wenn es gleichzeitig zur Störung der intestinalen Integrität, d.h. zu strukturellen Schäden in der Darmmukosa kommt. Diese Hypothese einer Kombination von morphologischen Veränderungen der Darmschleimhaut mit phänotypischen Veränderungen der IEL würde auch die fehlenden phänotypischen Veränderungen in dem hier verwendeten Sepsismodell erklären, da es hier nicht zu strukturellen Schäden der Darmmukosa kommt (Daten nicht dargestellt).

Interessanterweise bewirkte die Gabe von LPS erst innerhalb von 12 Stunden eine Steigerung der Proliferation und Zytotoxizität der IEL. Viel früher war hingegen eine gesteigerte Zytokinproduktion nachweisbar. Bereits drei Stunden nach LPS-Gabe konnte eine signifikant gesteigerte IFN- γ Produktion der isolierten IEL beobachtet werden. Da IFN- γ insbesondere zur Aktivierung von Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen führen kann (157), ist die Zunahme der proliferativen und zytolytischen Aktivität der IEL möglicherweise auch durch die IFN- γ Freisetzung in der Frühphase nach Endotoxinämie unterstützt worden. Ein weiterer Effekt der IFN- γ Produktion mag in der Stabilisierung der Epithelzellfunktion liegen, was wiederum zum Erhalt der mukosalen Integrität und damit zur Verringerung der bakteriellen Translokation geführt haben kann (24,158,159). Derartige positive Effekte von IFN- γ sind bei verschiedenen Infektionen nachgewiesen worden, in deren Verlauf IFN- γ eine zentrale Rolle bei der Entwicklung einer protektiven

Immunität zu spielen scheint (160,161).

Ein weiterer Hinweis auf die positive Wirkung von IFN- γ in der Sepsis stammt von Döcke et al. (162). Sie konnten bei septischen Patienten durch Gabe von IFN- γ eine Wiederherstellung der supprimierten Monozytenfunktion erreichen, was bei acht der neun Patienten zur Überwindung der Sepsis entscheidend beitrug.

Aber es wurden auch negative Effekte von IFN- γ beschrieben. Madara et al. (163) berichten über eine eingeschränkte Barrierefunktion von Epithelzellen in vitro nach Zugabe von IFN- γ . Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche deletäre Wirkung von IFN- γ ergab sich aus der Beobachtung, daß Mäuse ohne IFN- γ Rezeptor sich als resistent gegenüber Endotoxinschock erwiesen (164). Diese zweiseitige Wirkungsweise von IFN- γ erschwert die Beurteilung der Rolle dieses Zytokins in der Sepsis.

Denkbar ist folgendes vereinfachtes Szenario gastrointestinaler Infektionen: Die Translokation von Bakterien führt zur Endotoxämie und induziert einen frühen Anstieg der IFN- γ Produktion durch IEL. Die IFN- γ Freisetzung führt wiederum über eine autokrine Aktivierung zur Steigerung der zytolytischen und proliferativen Aktivität der IEL. Als Resultat dieser Aktivierung kommt es zur Beseitigung infizierter oder anderweitig alterierter Epithelzellen, die durch ihre gesteigerte MHC II - Expression oder die Expression von Streßproteinen von den IEL erkannt werden können (38,39). Die Wiederherstellung der mukosalen Integrität und Barrierefunktion wird weiterhin durch eine IFN- γ vermittelte Steigerung der Epithelzellmigration entlang der Villi unterstützt (159). Schließlich führt die Freisetzung von IFN- γ durch IEL zu einer gesteigerten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch Induktion der NOS-2 in den Epithelzellen (28,100), wie es auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte.

Ogleich der gesteigerten NO-Produktion im Rahmen der Sepsis auch negative Effekte wie z.B. therapierefraktäre Hypotension zugeschrieben werden (102), so weisen die positiven Effekte dieses Moleküls auf die Mikrozirkulation, seine hemmende Wirkung auf die Neutrophileninfiltration und schließlich die antimikrobiellen Effekte doch auf eine protektive Rolle von NO bei Sepsis hin (165,166).

So konnten Gianotti und Mitarbeiter (166) durch von L-Arginin, dem Substrat der NO-Synthase, das Überleben von Mäusen bei Peritonitis deutlich steigern. Durch gleichzeitige Gabe eines NOS-Inhibitors konnte der positive Effekt von L-Arginine aufgehoben werden, was auf die Produktion von NO als entscheidenden Mechanismus der L-Arginin-Gabe hinwies.

Die Vorstellung einer positiven Wirkung von NO wird weiterhin unterstützt durch die Beobachtung, daß die Hemmung der NO-Synthase zu einer Zunahme der Organschädigung bei LPS-induzierter Sepsis führt. (97,100,101, 137).

Zusammengefaßt kommt es nach Endotoxinämie zu einer sequentiellen Aktivierung verschiedener Abwehrmechanismen in der Darmschleimhaut. LPS führte zur funktionellen Aktivierung der IEL mit einer frühzeitig gesteigerten IFN- γ Produktion, sowie einer nachfolgenden Steigerung der zytolytischen und proliferativen Aktivität. Die gesteigerte NOS-2 Expression beruhte vermutlich u.a. auf der gesteigerten Zytokinproduktion der IEL. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß IEL während Septikämie nicht nur als zytolytische Effektorzellen zur Barrierefunktion beitragen, sondern auch regulierende Effekte auf weitere Abwehrmechanismen wie z.B. der Expression der NOS-2 entfalten.

5.3 MORBUS CROHN

Es existiert eine kaum überschaubare Anzahl von Publikationen über die immunologische Pathogenese des Morbus Crohn. Aber trotz der sich zum Teil widersprechenden Datenflut scheint die Dysregulation des Immunsystems zunehmend als entscheidender pathogenetischer Faktor dieser entzündlichen Darmerkrankung angesehen zu werden (72-74). Im Rahmen dieser Dysregulation scheint die überschießende und unverhältnismäßige Aktivierung intestinaler Lymphozyten eine wichtige Rolle zu spielen, wenngleich die auslösenden Momente für diese Aktivierung weiterhin ungeklärt sind (69,70,73,79,80).

Die Aktivierung intestinaler Lymphozyten konnte in der vorliegenden Arbeit bei Patienten mit Morbus Crohn ebenfalls nachgewiesen werden. Dabei zeigten die isolierten IEL eine gesteigerte zytolytische Aktivität gegenüber Tumorzellen epithelialen Ursprungs. Die gesteigerte zytolytische Aktivität war auf intestinale

Lymphozyten beschränkt und konnte bei peripheren Lymphozyten derselben Patienten nicht nachgewiesen werden.

Die zytolytische Aktivität von IEL unterscheidet sich erheblich von der peripherer T-Zellen oder NK-Zellen (40,41,167). Dementsprechend konnte gezeigt werden, daß die gesteigerte unspezifische zytolytische Aktivität der IEL bei Patienten mit Morbus Crohn weder auf NK-Aktivität beruhte, noch MHC restringiert war, da die verwendeten DLD-1 Tumorzellen praktisch kein MHC Klasse I exprimieren (167).

Die Ursache der lymphozytären Aktivierung bei Morbus Crohn ist bislang noch wenig verstanden. Allerdings weisen unsere Ergebnisse auf eine selektive Aktivierung intestinaler Lymphozyten im Verlauf der Erkrankung hin. Unsere Beobachtungen stimmen somit mit denen von Mullin et al. (80) überein, die eine erhöhte Expression von IL-2 mRNA nur im Darm nicht aber im peripheren Blut von Patienten mit Morbus Crohn nachweisen konnten. Weiter unterstützt wird das Konzept der intestinalen T-Zell-Aktivierung durch den Nachweis gesteigerter Proliferation und Zytokinproduktion von IEL-Zelllinien, die aus entzündlichen Regionen des Gastrointestinaltraktes von Patienten mit Morbus Crohn isoliert wurden (79).

Was aber triggert diese inadäquate Immunantwort? Luminale Antigene, werden seit langem für die Aktivierung des Immunsystems verantwortlich gemacht. Zu dieser Überzeugung kommen auch D'Haens et al. (78), die bei Patienten mit Morbus Crohn ein Rezidiv in einem bislang nicht betroffenen Darmabschnitt durch Ingestion von Darminhalt auslösen konnten. Unklar ist allerdings, welche Antigene des Darminhalts das Rezidiv auslösen. Neben Antigenen aus der Nahrung kommen Bakterien der intestinalen Flora als auslösende Agentien in Frage. Eine Kreuzreaktion gegenüber epithelialen Antigenen könnte dann den Entzündungsprozeß unterhalten. Ein derartige Kreuzreaktion könnte auch die von uns beobachtete zytolytische Aktivität der IEL gegenüber epithelialen Tumorzellen erklären.

Neben einer Kreuzreaktion zwischen bakteriellen und epithelialen Antigenen kommen noch weitere Mechanismen in Betracht. IEL wird auch beim Menschen eine Überwachungsfunktion in der intestinalen Mukosa zugeschrieben (10,41). In diesem Zusammenhang wird vermutet, daß IEL alterierte, entartete oder infizierte

Epithelzellen eliminieren. Erkannt werden diese Zellen z.B. an der Expression von Stressproteinen oder einer gesteigerten MHC-Expression (38,39). Die Induktion derartiger Oberflächenantigene im Rahmen der Entzündungsreaktion könnte einen Teufelskreis von intestinaler Schädigung und streß-induzierter MHC-Expression nach sich ziehen.

Die Unfähigkeit, die normale Immunantwort zu kontrollieren (73), sowie die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine kann dann den Entzündungsprozeß weiter unterhalten (73,79,80,168).

Neben einer T-Zell-Aktivierung mag aber auch die Veränderung der Subpopulationen zur gesteigerten zytolytischen Aktivität der IEL bei Patienten mit Morbus Crohn beigetragen haben. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten konnte eine Zunahme der CD8⁺ T-Zellen in der Darmschleimhaut nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse sind bei der histologischen Analyse von Proben aus der Darmschleimhaut von Patienten mit Morbus Crohn beschrieben (169). Neben einer Zunahme der zytotoxischen CD8⁺ IEL ist bei Patienten mit Morbus Crohn gleichzeitig auch über eine Zunahme der mRNA-Expression von Perforin und Granzyme A in isolierten IEL berichtet worden (170). Das bedeutet, dass es bei Morbus Crohn nicht allein zu einer Zunahme der zytotoxischen Zellen kommt, sondern gleichzeitig auch einer Aktivierung bereits existierender IEL stattfindet, die dann wiederum zur Gewebeerstörung beitragen können.

Zur Klärung der Frage, ob es bei Patienten mit Morbus Crohn zu einer generalisierten Aktivierung des Immunsystems kommt, oder ob die Aktivierung auf die intestinalen Lymphozyten beschränkt ist, wurden parallel zu den IEL auch die peripheren Lymphozyten der selben Patienten untersucht. Dabei konnten keine phänotypischen Unterschiede zwischen peripheren Blutlymphozyten von Patienten mit Morbus Crohn und Lymphozyten von Kontrollpatienten festgestellt werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Roman et al. (171), die ebenfalls keinen Unterschied zwischen peripheren Lymphozyten von Patienten mit oder ohne Morbus Crohn nachweisen konnten. Im Gegensatz dazu berichten Neil et al. (172) über einen verminderten Anteil von CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Morbus Crohn. Senju und Mitarbeiter (173) konnten hingegen einen

derartigen Abfall von $CD4^+$ T-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn nicht nachweisen unabhängig von der Schwere der Erkrankung.

Auch im Verhältnis von $\alpha\beta TCR^+$ und $\gamma\delta TCR^+$ T-Zellen im peripheren Blut war in der vorliegenden Studie kein Unterschied zwischen Patienten mit Morbus Crohn oder Kontrollpatienten festgestellt worden. Dies steht allerdings im Widerspruch zu den Beobachtungen von Söderström, der über eine Zunahme der $\gamma\delta TCR^+$ T-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit Morbus Crohn berichtet (174). Zu den Ursachen dieser unterschiedlichen Ergebnisse zählen möglicherweise die unterschiedlichen Patientenpopulationen und die Tatsache, daß der Einfluß medikamentöser Therapie (z. B. Steroide, Immunsuppressiva) auf den Phänotyp der Lymphozyten nicht berücksichtigt wurde.

Während in der vorliegenden Arbeit keine Veränderungen im Phänotyp peripherer T- und B-Zellen bei Morbus Crohn nachweisbar waren, fand sich bei den Patienten mit Morbus Crohn ein im Vergleich zu Kontrollpatienten signifikant geringerer Anteil von $CD3^+CD16^+$ NK-Zellen im peripheren Blut. Ein derartiger Abfall von NK-Zellen wurde bereits von Kontiainen et al. (175) beschrieben, die dies aber nur bei Patienten mit schwerer Ausprägung des Krankheitsbildes beobachten konnten, nicht aber bei Patienten mit milder Symptomatik. Während in den von uns durchgeführten Untersuchungen ein signifikanter Abfall der NK-Zell-Konzentration nur im peripheren Blut nachgewiesen werden konnte, existieren auch Berichte über verminderte NK-Zellen in der Rektumschleimhaut von Patienten mit Morbus Crohn (169). Hier bleibt anzumerken, daß in der vorliegenden Arbeit bereits bei den Kontrollpatienten weniger als 2% NK-Zellen aus der Darmschleimhaut isoliert werden konnten. Eine weitere Reduzierung der NK-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn deutete sich zwar an, erreichte aber keine statistische Signifikanz.

Die Mechanismen, die zur Reduktion der NK-Zellen im peripheren Blut, bzw. im Gastrointestinaltrakt bei Patienten mit Morbus Crohn führen sind nicht bekannt. So sind bei Patienten mit Morbus Crohn in der Regel eher solche Zytokine erhöht, die die NK-Zell-Funktion stimulieren und zur Zunahme der NK-Zellen (174) führen, wie IL-2, IFN- γ und IL-12 (73,79,167,168).

Ebenso ist wenig bekannt über den Effekt medikamentöser Therapie bei Morbus

Crohn auf die Anzahl und Funktion von NK-Zellen. Denkbar ist jedoch, daß ein niedriger Anteil an NK-Zellen eher durch die anti-inflammatorische, immunsuppressive Therapie als durch den Krankheitsprozeß induziert wird. Die prognostische Signifikanz und möglichen therapeutischen Konsequenzen müssen allerdings noch definiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß IEL aufgrund gesteigerter zytolytischer Aktivität gegenüber epithelialen Antigenen zum Krankheitsprozeß bei Morbus Crohn beitragen können. Ursache der gesteigerten zytolytischen Aktivität ist vermutlich sowohl die Zunahme der CD8⁺ Zellen in der Darmschleimhaut als auch die Aktivierung existierender IEL. Die phänotypischen Veränderungen und funktionelle Aktivierung der T-Zellen bei Morbus Crohn ist auf die intestinalen T-Zellen beschränkt und konnten bei peripheren Lymphozyten nicht nachgewiesen werden. Bei peripheren Lymphozyten zeigte sich ein Abfall des Anteils der NK-Zellen, dessen prognostische und therapeutische Bedeutung noch nicht geklärt ist.

5.4 INTESTINALE ISCHÄMIE/REPERFUSION

Die Bedeutung des Ischämie/Reperfusionsschadens (I/RS) bei der Entwicklung postoperativer Komplikation wird bei einer Vielzahl chirurgischer Krankheiten, die durch eine temporäre Unterbrechung der Blutversorgung gekennzeichnet sind, wie z.B. inkarzerierten Hernien, Volvulus oder akuten arteriellen Extremitätenverschlüssen, unterschätzt. Demgegenüber wird in der Transplantationsmedizin der Gewebeschädigung aufgrund von Ischämie und Reperfusion per se größere Aufmerksamkeit geschenkt und es existieren zahlreiche Ansätze zu Prophylaxe und Therapie des I/RS nach Organtransplantation.

Der Ischämie/Reperfusionsschaden nach Transplantation unterscheidet sich aber in mehreren Punkten vom I/RS bei den anderen oben genannten Krankheitsbildern. So wird bei der Transplantation das ischämische Organ mit einer Konservierungslösung perfundiert und kalt gelagert, bevor es einem Empfänger transplantiert wird, der keiner Organischämie ausgesetzt war. Beim I/RS nach Volvulus oder Mesenterialinfarkt kommt es hingegen zu einer warmen Ischämie des Organs ohne vorherige Perfusion mit einer protektiven

Konservierungslösung. Zusätzlich kommt es zu einem bislang wenig beachteten Einfluß der Ischämie des betroffenen Organs auf den Gesamtorganismus. So führt z.B. die Unterbrechung der intestinalen arteriellen Perfusion zu einer Verminderung des portalen Blutflusses und zur Umverteilung des Blutvolumens, ein Effekt, der möglicherweise zur Dissemination des I/RS beiträgt (176).

Trotz dieser Unterschiede scheinen dem I/RS nach warmer oder kalter Ischämie ähnliche pathophysiologische Mechanismen zugrunde zu liegen, die in den letzten Jahren näher charakterisiert worden sind. So konnte gezeigt werden, daß Sauerstoffradikale, die insbesondere in der Frühphase nach Reoxygenation gebildet werden, zentrale Mediatoren des Gewebeschadens sind (83,91-97).

Aber während in der Transplantationsmedizin durch Zugabe von Antioxidantien und Xanthinoxidasehemmern zu den Konservierungslösungen bereits während der Ischämiephase der Bildung der toxischen Sauerstoffradikalen vorgebeugt werden kann (177), scheint ein derartiges Konzept für die Behandlung des warmen I/RS nach z.B. Mesenterialinfarkt oder inkarzierter Hernie nicht geeignet. Diese Patienten sind vor einer möglichen Therapie bereits einer Ischämiephase unbestimmter Dauer ausgesetzt und können in der Regel erst kurz vor Reperfusion einer Behandlung zugeführt werden.

In der vorliegenden Studie wurde daher in einem Modell der warmen intestinalen Ischämie der Effekt einer Zytokinbehandlung kurz vor Reperfusion analysiert.

In diesem hier verwendeten Modell kam es nach intestinaler I/R zu einer schweren Gewebeschädigung des Darmes, sichtbar an der Erhöhung der Hyaluronsäurekonzentration im Serum (122). Die intestinale Ischämie führte aber nicht nur zur Schädigung des Darmes, sondern bewirkte auch eine Gewebeschädigung in der Leber. Diese Dissemination des I/RS schlug sich in einer Erhöhung der Transaminasen im Serum nieder. Auch dies stimmt mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein, die die Beteiligung primär nicht ischämischer Organe beim I/RS beschrieben haben (83-87). Welchen Anteil an der Dissemination des I/RS in dem hier verwendeten Modell die Verminderung des portalen Blutflusses hatte, läßt sich schwer eruieren, nicht zuletzt, weil eine intestinale Ischämie ohne Beeinflussung des portalen Blutflusses schwierig zu erreichen ist (176).

Wie bereits beschrieben, wird reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) eine entscheidende Rolle bei der Gewebeschädigung nach I/RS zugeschrieben (91-97). Die Freisetzung von ROS läßt sich u.a. über Veränderungen intrazellulärer Antioxidantien, wie z.B. Glutathion nachweisen. Glutathion, daß in der Zelle überwiegend in seiner reduzierten Form (GSH) vorliegt, trägt als Protonendonator zum Abbau der ROS bei (103-105). Der damit verbundene Konzentrationsabfall des reduzierten GSH kann als indirektes Maß für die in Anspruch genommene antioxidative Kapazität der Zelle genommen werden (103,105). Der von uns beobachtete Konzentrationsabfall des reduzierten GSH sowohl im Darm als auch in der Leber, in der Frühphase nach Reperfusion, deutet somit auf die Freisetzung von ROS nach selektiver intestinaler Ischämie und Reperfusion hin.

Die Verwendung von GSH als Marker des oxidativen Streß unterliegt allerdings einigen Einschränkungen, da Konzentrationsveränderungen des GSH nicht allein durch Oxidation verursacht werden müssen. So führt z.B. die Hemmung der Glutathionreduktase z.B. durch Stickstoffmonoxid ebenfalls zu einer Senkung der intrazellulären GSH-Konzentration (106). Da es in dem hier verwendeten Modell aber in der ersten Stunde nach Reperfusion zu keinem meßbaren signifikanten Anstieg der NO-Metabolite im Serum kam, scheint der Abfall der GSH-Konzentration in der ersten Stunde nach Reperfusion tatsächlich Folge der oxidativen Wirkung freigesetzter ROS gewesen zu sein.

Neben der Freisetzung von ROS kommt es im Rahmen des I/RS auch zu einer systemischen inflammatorischen Reaktion, die vermutlich zu den Organschäden beiträgt. Unklar ist bislang jedoch, ob sich eine Hemmung der inflammatorischen Antwort günstig auf den Gewebeschaden nach I/RS auswirkt. Über einen positiven Effekt einer anti-inflammatorischen Therapie berichteten Lane und Mitarbeiter (98), die eine verminderte Gewebeschädigung und geringere leukozytäre Infiltration nach I/RS durch Gabe von IL-10 beobachteten.

Umso überraschender waren die Ergebnisse der vorliegenden Studie, in der es nach Gabe von IL-10 nicht zu einer Abnahme, sondern zu einer Zunahme des Gewebeschadens sowohl im Darm als auch in der Leber kam.

Die gegensätzlichen Ergebnisse von Lane et al. (98) und der hier vorgelegten Studie beruhen möglicherweise u.a. auf dem Zeitpunkt der IL-10-Gabe. Lane und

Mitarbeiter verabreichten IL-10 bereits vor der Ischämiephase, wohingegen in der vorliegenden Studie die Zytokingabe erst zum Ende der Ischämiephase, also kurz vor Reperfusion erfolgte. Lane et al. beobachteten eine Verminderung der Neutrophileninfiltration in der Lunge nach Gabe von IL-10 (98). Da polymorphnukleäre Neutrophile als eine der Hauptquellen von ROS gelten (87,178), kann man spekulieren, ob die verminderte Neutrophileninfiltration in ihrer Studie auch zu einer verminderten Sauerstoffradikalfreisetzung geführt hat.

Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Studie nach Gabe von IL-10 ein signifikant stärker ausgeprägter Abfall der GSH-Konzentration nach Gabe von IL-10 beobachtet werden. Dieser GSH-Abfall deutet auf eine Zunahme des oxidativen Streß nach IL-10 als Ursache des ausgeprägteren Gewebeschadens im Darm nach I/RS hin (103). In der Leber konnte hingegen keine Zunahme des oxidativen Streß nach IL-10 Gabe beobachtet werden, was vermuten lässt, daß hier andere Faktoren zur Verschlechterung des I/RS nach IL-10 beigetragen haben.

Bei der Beobachtung eines negativen Effektes des anti-inflammatorischen IL-10 stellt sich die Frage nach dem Effekt eines pro-inflammatorischen Zytokins auf den Gewebeschaden. Interessanterweise war nach Gabe von IL-2 nur in der Leber, nicht aber im Darm eine signifikante Minderung des Gewebeschadens zu beobachten. Der positive Effekt der IL-2-Gabe war in der Leber jedoch nicht auf eine Minderung des oxidativen Streß zurückzuführen. Alle mit IL-2 behandelten Tiere wiesen in der ersten Stunde nach Reperfusion einen Abfall der GSH-Konzentration auf, der dem der unbehandelten Kontrolltiere entsprach, was auf ein ähnliches Ausmaß des oxidativen Streß in diesen beiden Gruppen hinweist.

Zusammengefaßt konnte gezeigt werden, daß es nach I/R zu oxidativem Streß in Darm und Leber kommt. Die Gabe von IL-10 führte zur Zunahme des Gewebeschadens in beiden Organen, die aber nur im Darm mit einer Zunahme des oxidativen Streß verbunden zu sein schien. Die Gabe von IL-2 führte hingegen nur in der Leber zu einer Verbesserung, was jedoch nicht auf einer Verminderung des oxidativen Streß beruhte.

Die mögliche Erklärung der Zunahme der Gewebeschädigung nach IL-10, bzw. der Verbesserung nach IL-2 beruht auf einer durch die Zytokingabe veränderten

Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO).

Eine gesteigerte NO-Freisetzung nach I/R und Sepsis ist bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen einschließlich unserer eigenen beschrieben worden (102,106,137,165,166,179-183). In Übereinstimmung damit konnte in der vorliegenden Studie eine gesteigerte NO-Freisetzung nach I/R beobachtet werden. Diese gesteigerte NO-Freisetzung beruhte auf der Induktion der NOS-2 nach intestinaler I/R sowohl in der Leber als auch im Darm.

Allerdings ist die Bedeutung von NO im Rahmen des I/RS noch umstritten. So werden verbesserte Mikrozirkulation, eine verminderte Leukozytenadhärenz und eine verminderte Histaminfreisetzung als positive Effekte der NO-Freisetzung genannt (178,181,182). Außerdem wurde eine gesteigerte NO-Produktion im Ileum als Grund für die relative Resistenz des Ileums gegenüber I/R induziertem Gewebeschaden angeführt (184). Gleichzeitig existieren aber Berichte über negative Effekte von NO im Rahmen des I/RS, bzw. über positive Effekte von NOS-Inhibitoren (102, 180)

Die vorliegende Studie scheint einen positiven Effekt der NO-Freisetzung, bzw. negative Effekte bei fehlender NO-Bildung zu belegen. So war der positive Effekt der IL-2-Gabe von einer verstärkten und verlängerten NOS-2 mRNA-Expression und einer gesteigerten NO-Freisetzung begleitet. Im Gegensatz dazu fehlte nach IL-10-Gabe ein Anstieg der NO-Metabolite im Serum. Tiere, die mit IL-10 behandelt worden waren, wiesen sogar geringere Nitrit/Nitratkonzentrationen nach I/R auf, als unbehandelte Tiere. Wir schließen daraus, daß die Zunahme der Gewebeschädigung nach IL-10-Gabe u.a. auf der verminderten NO-Freisetzung beruhte. Mit dieser reduzierten NO-Freisetzung könnte auch eine verminderte Neutralisation von ROS verbunden gewesen sein, was wiederum die Zunahme des oxidativen Streß im Darm nach IL-10-Gabe erklären helfen könnte.

Zur Klärung der Frage, ob noch andere Faktoren als oxidativer Streß und verminderte NO-Freisetzung zur Zunahme der Gewebeschädigung nach IL-10 beigetragen haben, wurde die Expression der induzierbaren Hämoxxygenase-1 analysiert. Dem Streßprotein HO-1 wird eine protektive Wirkung gegenüber oxidativem Streß zugesprochen (85,107-109). Diese protektive Wirkung wird vermutlich aber nicht durch das Enzym direkt, sondern durch die beim Abbau des

toxischen Häm entstehenden potenten Antioxidantien Bilirubin und Biliverdin vermittelt sowie durch das vasodilatatorisch wirkende Kohlenmonoxid (112). Während der Mangel an HO-1 mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber streß-induzierter Gewebeschädigung einhergeht (185), ist auch die Überexpression der HO-1 mit negativen Effekten behaftet. So kann die Überexpression der HO-1 u.a. zur Hemmung der zellulären Immunfunktion führen (186).

In der vorliegenden Studie führte die intestinale Ischämie/Reperfusion zu einer gesteigerten HO-1 mRNA-Expression in beiden Organen bis zu 24 Stunden nach Reperfusion. Nach Zytokingabe fanden sich unterschiedliche Effekte in Darm und Leber. In der Leber zeigte sich weder nach IL-2- noch nach IL-10-Gabe eine Veränderung der HO-1 Expression, so daß weder der positive Effekt von IL-2 noch der negative Effekt von IL-10 auf einer veränderte Expression der HO-1 zurückzuführen war.

Im Darm hingegen, zeigte sich eine deutliche Überexpression der HO-1 nach IL-2-Gabe und eine diskrete Verminderung der HO-1 mRNA Expression nach IL-10-Gabe. Die Überexpression der HO-1 mRNA im Darm könnte sich negativ auf den Ischämie/Reperfusionsschaden ausgewirkt haben und damit einen möglichen positiven Effekt der IL-2-Gabe im Darm egalisiert haben.

Zusammenfassend führt die selektive intestinale Ischämie zu einer Gewebeschädigung in Darm und Leber. Die Hemmung der inflammatorischen Antwort ist von einer Zunahme der Gewebeschädigung begleitet, die möglicherweise auf einer Zunahme des oxidativen Streß als auch auf der verminderten NO-Produktion beruhte.

Die Gabe des pro-inflammatorischen IL-2 führte zu einer Verminderung des Gewebeschadens in der Leber. Im Darm war hingegen keine Verbesserung des I/RS zu beobachten. Die Steigerung der NO-Produktion könnte zur Erklärung der verringerten hepatischen Schädigung beitragen. Der negative Effekt der IL-2-Gabe im Darm bleibt hingegen unklar, als Ursache ist die beobachtete Überexpression der Hämoxygenase-1 denkbar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es, intraepitheliale Lymphozyten bei verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen zu charakterisieren. Dazu wurden Phänotyp und Funktion der IEL nach Dünndarmtransplantation, bei akuter Graft-versus-Host-Reaktion, bei LPS-induzierter Sepsis und bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen charakterisiert.

Neben der immunologischen Aktivierung kommt es bei gastrointestinalen Erkrankungen aber auch zu einer Störung der mukosalen Integrität, wobei oxidativem Streß als pathogenetischem Faktor eine wichtige Rolle zugeschrieben wird. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher in einem Ischämie/Reperusionsmodell, einem Modell ohne allogene oder infektiöse Genese der Gewebeschädigung, das Ausmaß des oxidativen Streß und die Expression endogener Schutzmechanismen analysiert.

Nach allogener Dünndarmtransplantation war eine Infiltration der Darmschleimhaut mit Empfängerzellen und nach GvHR eine Infiltration der Darmschleimhaut mit Spenderzellen zu beobachten. Dabei wiesen die infiltrierenden Zellen unabhängig von Immunsuppression, akuter Abstoßung oder Schweregrad der GvHR einen Phänotyp auf, der identisch war mit dem nativer IEL. Im Verlauf der Erkrankung kam es zu einer weiteren phänotypischen Übereinstimmung von infiltrierenden Lymphozyten und IEL, so daß mehrere Monate nach Erkrankungsbeginn auch Subpopulationen der infiltrierenden Zellen nachgewiesen werden konnten, die typisch für IEL sind, aber im peripheren Immunsystem nicht vorkommen. Nach Dünndarmtransplantation oder GvHR migrieren selektiv bestimmte T-Zell Subpopulationen in die Darmschleimhaut, bzw. reifen infiltrierende Vorläuferzellen dort zu „IEL-ähnlicher“ Lymphozyten.

Sowohl bei akuter Abstoßung nach Dünndarmtransplantation als auch bei akuter intestinaler GvHR trat eine Gewebeerstörung im Gastrointestinaltrakt auf, für die infiltrierende, spezifische zytotoxische T-Zellen verantwortlich gemacht werden.

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte bei akuter Abstoßung nach allogener Dünndarmtransplantation eine gesteigerte spezifische zytolytische Aktivität isolierter IEL gegenüber Spenderantigenen nachgewiesen werden. Die

Herabsetzung dieser anti-Spender-Aktivität durch die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus unterstützt die Annahme einer Beteiligung spezifischer anti-Spender T-Zellen an der Gewebeerstörung bei akuter Abstoßung.

Eine spezifische zytolytische Aktivität der isolierten IEL konnte auch bei akuter GvHR nachgewiesen werden. Zusätzlich fand sich nach GvHR eine Steigerung der unspezifischen zytolytischen Aktivität der IEL. Dabei bleibt unklar, ob diese unspezifische zytolytische Aktivität tatsächlich zu einer Zunahme des Gewebeschadens bei GvHR geführt hat, oder ob die Aktivitätssteigerung nicht vielmehr Ausdruck der Überwachungsfunktion der IEL und damit notwendiger Bestandteil bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Barrierefunktion war.

Als Modell einer gram-negativen Infektion diente die intravenöse Gabe von LPS, das in der verwendeten Dosis bei Mäusen zu einem nicht-letalen septischen Krankheitsbild führte. In diesem Modell war eine Aktivitätszunahme der IEL mit Steigerung sowohl der zytolytischen als auch der proliferativen Aktivität, und einer Zunahme der Zytokinproduktion der isolierten Lymphozyten zu beobachten.

Die gesteigerte zytolytische Aktivität der IEL war Resultat einer funktionellen Aktivierung der Zellen und nicht auf die Expansion einer Subpopulation zurückzuführen. Die Zunahme der zytolytischen und proliferativen Aktivität der IEL nach Sepsis könnte aber auch autokrin durch die gesteigerte IFN- γ Freisetzung in der Frühphase nach Endotoxinämie unterstützt worden sein.

Denkbar ist folgendes vereinfachtes Szenario: Die Translokation von Bakterien führt zur Endotoxinämie und induziert einen frühen Anstieg der IFN- γ Produktion durch IEL. Die IFN- γ Freisetzung löst über eine autokrine Aktivierung eine Steigerung der zytolytischen und proliferativen Aktivität der IEL aus. Als Resultat dieser Aktivierung ergibt sich die Beseitigung infizierter oder alterierter Epithelzellen durch die aktivierten IEL. Schließlich führt die Freisetzung von IFN- γ durch IEL zu einer gesteigerten NO-Produktion aufgrund der Induktion der NOS-2 in den Epithelzellen, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte.

Zusammengefaßt kommt es nach Endotoxinämie zu einer sequentiellen Aktivierung verschiedener Abwehrmechanismen in der Darmschleimhaut. LPS

föhrte zur funktionellen Aktivierung der IEL mit einer fröhzeitig gesteigerten IFN- γ Produktion, sowie einer nachfolgenden Steigerung der zytolytischen und proliferativen Aktivität. Die gesteigerte NOS-2 Expression beruhte vermutlich u.a. auf der gesteigerten Zytokinproduktion der IEL. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß IEL während Septikämie nicht nur als zytolytische Effektorzellen zur Barrierefunktion beitragen, sondern auch als regulierende Zellen Effekte auf weitere Abwehrmechanismen wie der Expression der NOS-2 entfalten.

Immunologische Dysregulation kristallisiert sich zunehmend als entscheidender pathogenetischer Faktor der entzündlichen Darmerkrankung heraus. Dabei scheint die überschießende und unverhältnismäßige Aktivierung intestinaler Lymphozyten eine wichtige Rolle zu spielen, wenngleich die auslösenden Momente für diese Aktivierung noch ungeklärt sind.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Aktivierung intestinaler Lymphozyten bei Patienten mit Morbus Crohn nachgewiesen werden. Dabei zeigten die isolierten Zellen eine gesteigerte zytolytische Aktivität gegenüber Tumorzellen epithelialen Ursprungs. Diese gesteigerte Aktivität beruhte weder auf NK-Aktivität, noch war sie MHC-restringiert, beschränkte sich auf intestinale Lymphozyten und konnte bei peripheren Lymphozyten nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte bei diesen Patienten eine Zunahme der CD8⁺ T-Zellen in der Darmschleimhaut nachgewiesen werden. Diese Zunahme hat vermutlich auch zur Steigerung der zytolytische Aktivität der IEL beigetragen.

Die beobachteten phänotypischen und funktionellen Veränderungen fanden sich nur bei intestinalen Lymphozyten. Demgegenüber konnten wir weder phänotypische noch funktionelle Unterschiede zwischen peripheren Blutlymphozyten von Patienten mit Morbus Crohn und Lymphozyten von Kontrollpatienten nachweisen. Allerdings fand sich bei Patienten mit Morbus Crohn ein im Vergleich zu Kontrollpatienten signifikant geringerer Anteil von CD3⁺ CD16⁺ NK-Zellen im peripheren Blut. Die prognostische Signifikanz und mögliche therapeutische Konsequenzen dieses NK-Zell Abfalls müssen noch definiert werden.

Nach intestinaler Ischämie/Reperfusion (I/R) konnte eine schwere Gewebeschädigung des Darmes beobachtet werden. I/R föhrte aber nicht nur zur

Schädigung des Darmes, sondern bewirkte auch eine Gewebeschädigung in der Leber. Daran beteiligt waren vermutlich reaktive Sauerstoffradikale (ROS), deren Freisetzung in der Frühphase nach I/R durch den Konzentrationsabfall des reduzierten GSH sowohl im Darm als auch in der Leber nachgewiesen werden konnte.

Neben der Freisetzung von ROS kommt es im Rahmen des I/RS auch zu einer systemischen inflammatorischen Reaktion. Unklar ist bislang jedoch, ob sich eine Hemmung oder Stimulation der inflammatorischen Antwort günstig auf den Gewebeschaden nach I/RS auswirkt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, den I/RS durch Gabe des pro-inflammatorischen IL-2 und durch Gabe des anti-inflammatorischen IL-10 zu modulieren.

Dabei konnte gezeigt werden, daß die Gabe von IL-10 zur Zunahme des Gewebeschadens in beiden Organen führte, aber nur im Darm mit einer Zunahme des oxidativen Streß verbunden war. Die Gabe von IL-2 führte hingegen vor allem in der Leber zu einer Verbesserung des I/RS, was jedoch nicht auf einer Verminderung des oxidativen Streß beruhte.

Die Zunahme der Gewebeschädigung nach IL-10, bzw. der Verbesserung nach IL-2 läßt sich möglicherweise auf eine durch die Zytokingabe veränderte Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) zurückführen. So war der positive Effekt der IL-2-Gabe von einer verstärkten und verlängerten NOS-2 mRNA-Expression und einer gesteigerten NO-Freisetzung begleitet. Im Gegensatz dazu fehlte nach IL-10-Gabe ein Anstieg der NO-Metabolite im Serum.

Wir schließen daraus, daß die Zunahme der Gewebeschädigung nach IL-10-Gabe u.a. auf der verminderten NO-Freisetzung beruhte. Mit dieser reduzierten NO-Freisetzung könnte auch eine verminderte Neutralisation von ROS verbunden gewesen sein, was wiederum die Zunahme des oxidativen Streß im Darm nach IL-10-Gabe erklären helfen könnte.

Zur Klärung der Frage, ob noch andere Faktoren als oxidativer Streß und verminderte NO-Freisetzung zur Zunahme der Gewebeschädigung nach IL-10 beigetragen haben, wurde die Expression der induzierbaren Hämoxxygenase-1 analysiert. In der vorliegenden Studie führte I/R zu einer gesteigerten HO-1 mRNA-Expression in beiden Organen. Nach Zytokingabe fanden sich

unterschiedliche Effekte in Darm und Leber. In der Leber zeigte sich weder nach IL-2- noch nach IL-10-Gabe eine Veränderung der HO-1 Expression, so daß weder der positive Effekt von IL-2 noch der negative Effekt von IL-10 auf einer veränderte Expression der HO-1 zurückzuführen war. Im Darm hingegen, zeigte sich eine deutliche Überexpression der HO-1 nach IL-2 Gabe und eine diskrete Verminderung der HO-1 mRNA-Expression nach IL-10 Gabe. Die Überexpression der HO-1 mRNA im Darm könnte sich negativ auf den Ischämie/Reperfusionsschaden ausgewirkt haben, und damit einen möglichen positiven Effekt der IL-2-Gabe im Darm egalisiert haben.

Zusammenfassend führt die selektive intestinale Ischämie zu einer Gewebeschädigung in Darm und Leber. Die Hemmung der inflammatorischen Antwort ist von einer Zunahme der Gewebeschädigung begleitet, die möglicherweise auf einer Zunahme des oxidativen Streß, als auch auf der verminderten NO-Produktion beruhte.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Brandtzaeg P. Overview of the mucosal immune system. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1989; **146**:13-25.
2. James SP. Mucosal T-cell function. *Gastroenterol Clin North America.* 1991; **20**:597-612.
3. Zeitz M, Schieferdecker HL, Ullrich R, Jahn HU, James SP, Riecken EO. Phenotype and function of lamina propria lymphocytes. *Immunol Res.* 1991; **10**:199-206.
4. Maloy KJ, Mowat AM, Zamoyska R, Crispe IN. Phenotypic heterogeneity of intraepithelial T lymphocytes from mouse small intestine. *Immunology.* 1991; **72**: 555-562.
5. Lefrancois L. Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J Immunol.* 1991; **147**: 1746-1751.
6. Poussier P, Edouard P, Lee C, Binnie M, Julius M. Thymus-independent development and negative selection of T cells expressing T cell receptor α/β in the intestinal epithelium: evidence for distinct circulation patterns of gut- and thymus- derived T lymphocytes. *J Exp Med.* 1992; **176**: 187-199.
7. Mosley RL, Styre D, Klein JR. Differentiation and functional maturation of bone marrow derived intestinal epithelial T cells expressing membrane T cell receptor in athymic radiation chimeras. *J Immunol.* 1990; **145**: 1369-1375.
8. Barrett TA, Gajewski TF, Danielpour D, Chang EB, Beagley KW, Bluestone JA. Differential function of intestinal intraepithelial lymphocyte subsets. *J Immunol.* 1992; **149**: 1124-1130.
9. Taguchi T, Aicher WK, Fujihashi K, Yanamoto M, McGhee JR, Bluestone JA, Kiyono H. Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes. Murine CD3⁺, γ/δ TCR⁺ T-cells produce IFN- γ and IL-5. *J Immunol.* 1991; **147**: 3736-3744.
10. James SP. The gastrointestinal mucosal immune system. *Dig Dis.* 1993; **11**: 146-156.

11. Goodman T, Lefrancois L. Expression of the γ/δ T-cell receptor on intestinal CD8⁺ intraepithelial lymphocytes. *Nature*. 1988; 333: 855-858.
12. Goodman T, Lefrancois L. Intraepithelial lymphocytes. Anatomical site not T cell receptor form dictates phenotype and function. *J Exp Med*. 1989; 170: 1569-1581.
13. Fujihashi K, Taguchi T, Aicher WK, McGhee JR, Bluestone JA, Eldridge JH, Kiyono H. Immunoregulatory functions for murine intraepithelial lymphocytes: γ/δ T cell receptor-positive (TCR⁺) T cells abrogate oral tolerance, while $\alpha\beta$ TCR⁺ T cells provide B cell help. *J Exp Med*. 1992; 175: 695-707.
14. Schattenfroh NC, Hoffman RA, McCarthy SA, Simmons RL. Phenotypic analysis of donor cells infiltrating the small intestinal epithelium and spleen during graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1995; 59: 268-273.
15. Deusch K, Lüling F, Reich K, Classen M, Wagner H, Pfeffer K. A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the γ/δ T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V δ 1 gene segment. *Eur J Immunol*. 1991; 21: 1053-1059.
16. Nüssler NC, Stange B, Hoffman RA, Schraut WH, Bauer AJ, Neuhaus P. Enhanced cytolytic activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in patients with Crohn's disease. *Langbeck's Arch Surg*. 2000; 385: 218-224.
17. Rocha B, von Boehmer H, Guy-Grand D. Selection of intraepithelial lymphocytes with CD8 α/α co-receptors by self-antigen in the gut. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 5336-5340.
18. Guy-Grand D, Cerf-Bensussan N, Malissen B, Malassis-Seris M, Briottet C, Vassalli P. Two gut intraepithelial CD8⁺ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med*. 1991; 173: 471-481.
19. Regnault A, Cumano A, Vassalli P, Guy-Grand D, Kourilsky P. Oligoclonal repertoire of the CD8 $\alpha\alpha$ and the CD $\alpha\beta$ TCR- α/β murine intestinal intraepithelial T lymphocytes: Evidence for the random emergence of T

- cells. *J Exp Med.* 1994; *180*: 1345-1358.
20. Arstila T, Arstila TP, Calbo S, Selz F, Malassis-Seris M, Vassalli P, Kourilsky P, Guy-Grand D. Identical T cell clones are located within the mouse gut epithelium and lamina propria and circulate in the thoracic duct lymph. *J Exp Med.* 2000; *191*: 823-834.
21. Sydora BC, Mixter PF, Holcombe HR, Eghtesady P, Williams K, Amaral MC, Nel A, Kronenberg M. Intestinal intraepithelial lymphocytes are activated and cytolytic but do not proliferate as well as other T cells in response to mitogenic signals. *J Immunol.* 1993; *150*: 2179-2191.
22. van Houten N, Mixter PF, Wolfe J, Budd RC. CD2 expression on murine intestinal intraepithelial lymphocytes is bimodal and defines proliferative capacity. *Int Immunol.* 1993; *5*: 665-672.
23. Gramzinski RA, Adams E, Gross JA, Goodman TG, Allison JP, Lefrancois L. T cell receptor-triggered activation of intraepithelial lymphocytes in vitro. *Int Immunol.* 1993; *5*: 145-153.
24. Carol M, Lambrechts A, Van Gossum A, Libin M, Goldman M, Mascart-Lemone F. Spontaneous secretion of interferon γ and interleukin-4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. *Gut.* 1998; *42*: 643-649.
25. Yanamoto M, Fujihashi K, Beagley KW, McGhee JR, Kiyono H. Cytokine synthesis by intestinal intraepithelial lymphocytes. Both $\gamma\delta$ T cell receptor-positive and $\alpha\beta$ T cell receptor-positive T cells in the G₁ phase of cell cycle produce IFN- γ and IL-5. *J Immunol.* 1993; *150*: 106-114.
26. Yanamoto S, Russ F, Teixeira HC, Conradt P, Kaufmann SHE. *Listeria monocytogenes*-induced gamma interferon secretion by intestinal intraepithelial $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Infect Immunol.* 1993; *61*: 2154-2161.
27. Lundqvist C, Melgar S, Yeung MM, Hammarström S, Hammarström M-L. Intraepithelial lymphocytes in human gut have lytic potential and a cytokine profile that suggest T helper 1 and cytotoxic functions. *J Immunol.* 1996; *157*: 1926-1934.

28. Hoffman RA. Intraepithelial lymphocytes coinduce nitric oxide synthase in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol.* 2000; 278: G886-G894.
29. Fujihashi K, Yanamoto M, McGhee JR, Kiyono H. $\alpha\beta$ T cell receptor-positive intraepithelial lymphocytes with CD4⁺, CD8⁻ and CD4⁺, CD8⁺ phenotypes from orally immunized mice provide Th2-like function for B cell responses. *J Immunol.* 1993; 151: 6681-6691.
30. Lefrancois L, Goodman T. In vivo modulation of cytolytic activity and Thy-1 expression of TCR $\gamma\delta$ ⁺ intraepithelial lymphocytes. *Science.* 1989; 243: 1716-1718.
31. Ishikawa H, Li Y, Abeliovich A, Yanamoto S, Kaufmann SHE, Tonegawa S. Cytotoxic and interferon- γ producing activities of $\gamma\delta$ T cells in the mouse small intestinal epithelium are strain dependent. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 8204-8208.
32. Kawaguchi M, Nanno M, Umesaki Y, Matsumoto S, Okada Y, Cai Z, Shimamura T, Matsuoka Y, Ohwaki M, Ishikawa H. Cytolytic activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in germ-free mice is strain dependent and determined by T cells expressing $\gamma\delta$ T-cell antigen receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 8591-8594.
33. Guy-Grand D, Malassis-Seris M, Briottet C, Vassalli P. Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependent and independent intraepithelial T lymphocytes is induced locally. Correlation between functional assays, presence of perforine and granzyme transcripts and cytoplasmic granules. *J Exp Med.* 1991; 173: 1549-1552.
34. Lepage AC, Buzoni-Gatel D, Bout DT, Kasper LH. Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1998; 161: 4902-4908.
35. Offit PA, Dudzik KI. Rotavirus specific cytotoxic T lymphocytes appear at the intestinal mucosal surface after rotavirus infection. *J Virol.* 1989; 63: 3507-3512.
36. Sydora BC, Jamieson BD, Ahmed R, Kronenberg M. Intestinal intraepithelial

- lymphocytes respond to systemic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Cell Immunol.* 1996; **167**: 161-169.
37. Müller S, Bühler-Jungo M, Mueller C. Intestinal intraepithelial lymphocytes exert potent protective cytotoxic activity during an acute virus infection. *J Immunol.* 2000; **164**: 1986-1994.
38. Born W, Hall L, Dallas A, Boymel J, Shinnick T, Yound D, Brennan P, O'Brien R. Recognition of a peptide antigen by heat shock-reactive $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Science.* 1990; **249**: 67-69.
39. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science.* 1998; **279**: 1737-1740.
40. Roberts AI, O'Connell SM, Ebert EC. Intestinal intraepithelial lymphocytes bind to colon cancer cells by HML-1 and CD11a. *Cancer Res.* 1993; **53**: 1608-1611.
41. Taunk J, Robert AI, Ebert EC. Spontaneous cytotoxicity of human intraepithelial lymphocytes against epithelial cell tumors. *Gastroenterology.* 1992; **102**: 69-75.
42. Grover R, Ingham Clark CL, Pockley AG, Lear PA, Wood RFM. Host cell infiltration of the intraepithelial compartment in small bowel transplantation. *Transplant Proc.* 1993; **25**: 900.
43. Ingham Clark CL, Cunningham AJ, Crane PW, Wood RFM, Lear PA. Lymphocyte infiltration patterns in rat small bowel transplants. *Transplant Proc.* 1990; **22**: 2460.
44. Oberhuber G, Schmid T, Thaler W, Waitz W, Luze T, Klima G, Margreiter R. Increase in intraepithelial lymphocytes as an early marker of rejection in a fully allogeneic rat small bowel transplantation model. *Eur Surg Res.* 1993; **25**: 310-315.
45. Foker E, Najarian JS. Allograft rejection III: the pathobiology of organ rejection. in: Najarian JS and Simmons RL (eds). *Transplantation.* 1972; 122.
46. Murase N, Demetris AJ, Woo J, Furuya T, Nalesnik M, Tanabe M, Todo S, Starzl TE. Lymphocyte traffic and graft-versus-host disease after fully

- allogeneic small bowel transplantation. *Transplant Proc.* 1991; 23: 3246-3247.
47. Sirinek LP, O'Dorisio MS, Dunaway DJ. Accumulation of donor-specific cytotoxic T cells in intestinal lymphoid tissues following intestinal transplantation. *J Clin Immunol.* 1995; 15: 258-265.
48. Ferrara JLM, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *New Engl J Med.* 1991; 324: 667-674.
49. Kelemen E, Szebeni J, Petranyi GG. Graft-versus-host disease in bone marrow transplantation: Experimental, laboratory, and clinical contributions of the last few years. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993; 102: 309-320.
50. Via CS. Kinetics of T cell activation in acute and chronic forms of murine graft-versus-host disease. *J Immunol.* 1991; 146: 2603-2609.
51. Nüssler NC, Hoffman RA, McCarthy SA, Simmons RL. Functional changes of intestinal intraepithelial lymphocytes during acute graft-versus-host disease: correlation with phenotype. *Int Immunol.* 1996; 8: 1767-1777.
52. Lehnert S, Rybka WB, Seemayer TA. Amplification of the graft-versus-host reaction by partial body irradiation. *Transplantation.* 1986; 41: 675-679.
53. Mowat AM, Ferguson A. Intraepithelial lymphocyte count and crypt hyperplasia measure the mucosal component for the graft-versus-host reaction in mouse small intestine. *Gastroenterology.* 1982; 83: 417-423.
54. Guy-Grand D, Vasalli P. Gut injury in mouse graft-versus-host reaction. *J Clin Invest.* 1986; 77: 1584-1595.
55. Weisdorf SA, Roy J, Snover D, Platt JL, Weisdorf DJ. Inflammatory cells in graft-versus-host disease on the rectum: Immunopathologic analysis. *Bone Marrow Transplant.* 1991; 7: 297-301.
56. Tsuzuki T, Yoshikai Y, Ito M, Mori N, Ohbayashi M, Asai J. Kinetics of intestinal intraepithelial lymphocytes during acute graft-versus-host disease in mice. *Eur J Immunol.* 1994; 24: 709-715.
57. Steinhoff U, Klemm U, Greiner M, Bordasch K, Kaufmann SHE. Altered

- intestinal immune system but normal antibacterial resistance in the absence of P-selectin and ICAM-1. *J Immunol.* 1998; 160: 6112-6120.
58. Roy J, Platt JL, Weisdorf DJ. The immunopathology of upper gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Transplantation.* 1993; 44: 572-577.
59. Parrillo JE. Mechanisms of disease: Pathogenetic mechanisms of septic shock. *New Engl J Med.* 1993; 328: 1271-1277.
60. Amura CR, Silverstein R, Morrison DC. Mechanisms involved in the pathogenesis of sepsis are not necessarily reflected by in vitro cell activation studies. *Infect Immun.* 1998; 66: 5372-5378.
61. Bone RC. Gram-negative sepsis: A dilemma of modern medicine. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6: 57-68.
62. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun.* 1979; 23: 403-411.
63. Albanese CT, Cardona M, Smith SD, Watkins S, Kurkchubasche AG, Ulman I, Simmons RL, Rowe MI. Role of intestinal mucus in transepithelial passage of bacteria across the intact ileum in vitro. *Surgery.* 1994; 116: 76-82.
64. Gautreaux MD, Deitch EA, Berg RD. T Lymphocytes in host defense against bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Infect Immun.* 1994; 62: 2874-2884.
65. Eaves-Pyles T, Wong HR, Alexander JW. Sodium arsenite induces the stress response in the gut and decreases bacterial translocation in a burned mouse model with gut-derived sepsis. *Shock.* 2000; 13: 314-319.
66. Deitch EA, Berg R, Specian R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg.* 1987; 122: 185-190.
67. Buzoni-Gatel D, Debbabi H, Moretto M, Dimier-Poisson IH, Lepage AC, Bout DT, Kasper LH. Intraepithelial lymphocytes travel to the intestine and enhance resistance to *Toxoplasma gondii* oral infection. *J Immunol.* 1999; 162: 5846-5852.

68. Österberg J, Johnsson C, Gannedahl G, Westlund A, Haglund U. Alterations in mucosal immune cell distribution in septic rats. *Shock*. 1997; 7: 182-185.
69. Kirsner JB, Shorter RG. Recent developments in "non-specific" inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 1982; 306: 775-785.
70. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease (first of two parts). *N Engl J Med*. 1991; 325: 928-937.
71. Schreiber S, Raedler A, Stenson WF, MacDermott RP. The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 1992; 21: 451-502.
72. MacDonald TT. The role of activated T lymphocytes in gastrointestinal disease. *Clin Exp Allergy*. 1990; 20: 247-252.
73. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993; 75: 263-274.
74. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*. 1993; 75: 253-261.
75. Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell*. 1993; 75: 275-282.
76. Brynskov J, Freund L, Rasmussen SN, Lauritsen K, Schaffalitzky de Muckadell O, Williams N, MacDonald AS, Tanton R, Molina F, Campanini MC, Bianchi P, Ranzi T, Quarto di Palo F, Malchow-Møller A, Østergaard Thomsen O, Tage-Jensen U, Binder V, Riis P. A placebo-controlled double-blind randomized trial of cyclosporine therapy in active chronic Crohn's disease. *N Engl J Med*. 1989; 321: 845-850.
77. Lopez-Cubero SO, Sullivan KM, McDonald GB. Course of Crohn's disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Gastroenterology*. 1998; 114: 433-440.
78. D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal

- contents in excluded ileum. *Gastroenterology*. 1998; 114: 262-267.
79. Watanabe M, Hayashi A, Hosoda Y, Ohara M, Iwao Y, Ishii H, Ishikawa H, Nanno M, Hibi T. Preferential activation of CD4⁺Vβ5.2/5.3⁺ intestinal intraepithelial lymphocytes in the inflamed lesions of Crohn's disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996; 78: 130-139.
80. Mullin GE, Lazenby AJ, Harris ML, Bayless TM, James SP. Increased Interleukin-2 messenger RNA in the intestinal mucosal lesions of Crohn's disease but Ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1992; 102: 1620-1627.
81. Haglund U. Gut ischemia. *Gut*. 1994; *suppl 1*: S73-S76.
82. Haglund U, Bergqvist D. Intestinal ischemia - the basics. *Langenbeck's Arch Surg*. 1999; 384: 233-238.
83. Kong S-E, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauly RD, Hall JC. Ischemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust N Z J Surg*. 1998; 68: 554-561.
84. Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Koeike K, Banerjee A. Simultaneous liver and lung injury following gut ischemia is mediated by xanthine oxidase. *J Trauma*. 1992; 32: 723-728.
85. Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke H, Coito AJ, Shen XD, Zhao D, Zaky J, Lassmann CR, Kolls JK, Alam I, Ritter T, Volk HD, Farmer D, Ghobrial RM, Busttil RW, Kpiec-Weglinski JW. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*. 1999; 104: 1631-1639.
86. Yao YM, Sheng ZY, Yu Y, Tian HM, Wang YP, Lu LR, Xu SH. The potential etiologic role of tumor necrosis factor in mediating multiple organ dysfunction in rats following intestinal ischemia-reperfusion injury. *Resuscitation*. 1995; 29: 157-168.
87. Moore EE, Moore FA, Francoise RJ, Kim FJ, Biffl WL, Banerjee A. The post-ischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. *J Trauma*. 1994; 37: 881-887.
88. Deitch EA. Multiple organ failure: pathophysiology future therapy. *Ann Surg*. 1992; 216: 117-134.

89. Zhi-Yong S, Dong YL, Wang XH. Bacterial translocation and multiple system organ failure in bowel ischemia and reperfusion. *J Trauma*. 1992; 32: 148-153.
90. Illyés G, Hammar J. Sequence of morphological alterations in a small intestinal ischemia/reperfusion model of the anesthetized rat. *Int J Exp Pathol*. 1992; 73: 161-172.
91. Weixiong H, Aneman A, Nilsson U, Lundgren O. Quantification of tissue damage in the feline small intestine during ischemia-reperfusion: the importance of free radicals. *Acta Physiol Scand*. 1994; 150: 241-250.
92. Granger DN, McCord JM, Parks DA, Hollwarth ME. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology*. 1986; 90: 80-84.
93. Arthur MJ. Reactive oxygen intermediates and liver injury. *J Hepatol*. 1988; 6: 125-131.
94. Tribble DL, Aw TK, Jones DP. The pathophysical significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology*. 1987; 7: 377-387.
95. Nüssler AK, Wittel UA, Nüssler NC, Beger HG. Leukocytes, the Janus cells in inflammatory disease. *Langenbeck's Arch Surg*. 1999; 384: 222-232.
96. Shu Z, Jung M, Beger HG, Marzinzig M, Han F, Butzer U, Bruckner UB, Nüssler AK. Effects of pH-dependent changes on nitric oxide, peroxynitrite, and reactive oxygen species in hepatocellular damage. *Am J Physiol*. 1997; 36: G1118-G1123.
97. Jung M, Drapier JC, Weidenbach H, Renia L, Oliveira L, Wang A, Beger HG, Nüssler AK. Effects of intracellular iron levels on nitric oxide and reactive oxygen intermediates in experimental sepsis. *J Hepatol*. 2000; 33: 387-392.
98. Lane JS, Todd KE, Lewis MPN, Gloor B, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW, Chandler CF. Interleukin-10 reduces the systemic inflammatory response in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion. *Surgery*. 1997; 122: 288-294.
99. Chan KL, Chan KW, Tam PKH. Segmental small bowel allograft-ischemic

- injury and regeneration. *J Pediatr Surg.* 1998; 33: 1703-1706.
100. Hoffman RA, Zhang G, Nüssler NC, Gleixner SL, Ford HR, Simmons RL, Watkins SC. Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in the mouse ileal mucosa. *Am J Physiol.* 1997; 272: G383-392.
101. Nüssler AK, Beger HG, Liu Z-Z, Billiar TR. NO, hepatocytes and inflammation. *Res. Immunol.* 1995; 146: 671-675.
102. Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet.* 1991; 338: 1557-1558.
103. Högberg J, Kristoferson A. A correlation between glutathione levels and cellular damage in isolated hepatocytes. *Eur J Biochem.* 1977; 74: 77-82.
104. Meister A. Glutathion deficiency produced by inhibition of its synthesis and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol Ther.* 1991; 51: 155-194.
105. Anderson ME. Glutathion: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact.* 1998; 111: 1-14.
106. Butzer U, Weidenbach H, Gansauge F, Beger HG, Nussler AK. Increased oxidative stress in the RAW 264.7 macrophage cell line is partially mediated via the S-nitrosothiol-induced inhibition of glutathion reductase. *FEBS Lett.* 1999; 445: 274-278.
107. Abraham NG, Lavrovsky Y, Schwartzmann ML, Stoltz RA, Levere RD, Gerritsen ME, Shibahara S, Kappas A. Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 6798-6802.
108. Otterbein LE, Lee PJ, Chin BY, Petrache I, Camhi SL, Alain J, Choi AM. Protective effects of heme oxygenase-1 in acute lung injury. *Chest.* 1999; 116: 61S-63S.
109. Maines MH. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms and clinical applications. *FASEB J.* 1988; 2: 2557-2568.

110. Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem.* 1986; 261: 411-419.
111. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y, Suematsu M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leucocyte adhesion elicited by oxidative stress. *Circ Res.* 1999; 85: 663-671
112. Stocker R, Glaser AN, Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84: S918-S922.
113. Motterlini R, Foresti R, Intraglietta M, Winslow RM. NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am J Physiol.* 1996; 39: H107-H114
114. Lee KK, Schraut WH. Structure and function of orthotopic small bowel allografts in rats treated with cyclosporine. *Am J Surg.* 1986; 151: 55-60.
115. Hoffman AL, Makowka L, Banner B, Cai X, Cramer DV, Pascualone A, Todo S, Starzl TE. The use of FK-506 for small intestine allotransplantation. *Transplantation.* 1990; 49: 483-490.
116. Lee K, Stangl MJ, Todo S, Langrehr JM, Starzl TE, Schraut WH. Successful orthotopic small bowel transplantation with short term FK 506 immunosuppressive therapy. *Transplant Proc.* 1990; 22: 78-79.
117. Hoffman RA, Langrehr JM, Wren SM, Dull KE, Jldstad ST, McCarthy SA, Simmons RL. Characterization of the immunosuppressive effects of nitric oxide during graft-versus-host disease. *J Immunol.* 1993; 151: 1508-1518.
118. Via CS, Finkelman FD. Critical role of interleukin-2 in the development of acute graft-versus-host disease. *Intl Immunol.* 1993; 5: 565-572.
119. Leon LR, Kozak W, Rudolph K, Kluger MJ. An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice. *Am J Physiol.* 1999; 276: R81-R89.
120. Susan O. Sharron. Immunofluorescence and cell sorting. in: *Curr Prot Immunology.* eds: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Sherach EM, Strober W, John Wiley & Sons, Inc. Vol.1, pp 2.1.2 - 2.1.20.

121. Antibody detection and preparation. in: Curr Prot. Immunology. eds: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Sherach EM, Strober W, John Wiley & Sons, Inc. Vol. 1; pp 5.1.1 – 5.2.8.
122. Müller AR, Platz KP, Heckert C, Häusler M, Guckelberger O, Schuppan D, Lobeck H, Neuhaus P. The extracellular matrix an early target of preservation/reperfusion injury and acute rejection after small bowel transplantation. *Transplantation*. 1998; 65: 770-776.
123. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-526.
124. Marzinzig M, Nüssler AK, Stadler J, Marzinzig E, Bartlen W, Morris Jr SM, Nüssler NC, Beger HG, Brückner UB. Improved methods to measure the stable end products of nitric oxide (NO): nitrite, nitrate, and s-nitroso thiols. *Nitric Oxide*. 1997; 2: 177-189.
125. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*. 1990; 36: 1440-1443.
126. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem*. 1969; 27: 502-522.
127. Baker MA, Cerniglie GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione-disulfide in large number of biological samples. *Annal Biochem*. 1990; 190: 360-365.
128. Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, Vannier B, Lorenzon G. A microtiter assay for total glutathione and glutathione-disulfide contents in cultured / isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol Toxicol*. 1994; 10: 415-421.
129. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275.
130. Lüss H, Nüssler NC, Beger H-G, Nüssler AK. Expression and detection of inducible nitric oxide synthase in experimental models of inflammation. *Methods*. 1996; 10: 51-60.

131. Sonin NV; Garcia-Pagan JC, Nakanishi K, Zhang JX, Clemens MG. Patterns of vasoregulatory gene expression in the liver response to ischemia reperfusion and endotoxemia. *Shock*. 1999; 11: 175-179.
132. Monpoeho S, dehee A, Mignotte B, Schwartzbrod L, Marechal V, Nicolas JC, Billaudel S, Ferre V. Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *Biotechniques* 2000; 29: 88-93
133. Zhong R, He G, Sakai Y, Zhang Z, Gracia B, Li XC, Jevnikar A, Grant D. The effect of donor-recipient strain combination on rejection and graft-versus-host disease after small bowel/liver transplantation. *Transplantation*. 1993; 56: 381-385.
134. Tanabe M. The influence of donor and recipient strains in isolated small bowel transplantation in the rat. *Transplant Proc*. 1994; 26: 4325-4332.
135. Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 5939-5943.
136. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca^{++} -dependent and Ca^{++} -independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett*. 1991; 291: 145-149.
137. Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J, Simmons RL. Nitric oxide synthesis serves to reduce hepatic damage during acute murine endotoxemia. *Crit Care Med*. 1992; 20: 1568-1574.
138. Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Lie R, Suzuki T, Nakayama K, Takeda A, Yamaguchi T, Hoyama Y, Sekizawa K, Sasaki H. Protective effects of heme oxygenase-1 against oxidant-induced injury in the cultured human tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999; 21: 428-435.
139. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Eng1 J Med*. 1993; 329: 2002-2012.
140. Adams DH, Neuberger JM. Patters of graft rejection following liver transplantation. *J Hepatol*. 1990; 10: 113-119.

141. Lear P, Ingham Clark C, Crane P, Pockley G, Wood R. Donor cell infiltration of recipient tissue as an indicator of small bowel allograft rejection in the rat. *Transplant Int.* 1993; 6: 85-88.
142. Murase N, Todo S, Cramer DV, Fung J, Starzl TE. Induction of liver heart and multivisceral graft acceptance with a short course of FK 506. *Transplant Proc.* 1990; 22: 74-75.
143. Grover R, Lear PA, Ingham Clark CL, Pockley AG, Wood RFM. Method for diagnosing rejection in small bowel transplantation. *Br J Surg.* 1993; 80: 1024-1026.
144. Murase N, Demetris AJ, Matsuzaki T, Yagihashi A, Todo S, Fung J, Starzl TE. Long survival in rats after multi-visceral versus isolated small-bowel allotransplantation under FK 506. *Surgery.* 1991; 110: 87-98.
145. Chao C-C, Sandor M, Dailey MO. Expression and regulation of adhesion molecules by $\gamma\delta$ T cells from lymphoid tissues and intestinal epithelium. *Eur J Immunol.* 1994; 24: 3180-3187.
146. Eiras P, Leon F, Camarero C, Lombardia M, Roldan E, Bootello A, Roy G. Intestinal Intraepithelial lymphocytes contain a CD3⁻ CD7⁺ subset expressing natural killer markers and a singular pattern of adhesion molecules. *Scand J Immunol.* 2000; 52: 1-6.
147. Morrissey PJ, Charrier K, Horovitz DA, Fletcher FA, Watson JD. Analysis of the intra-epithelial lymphocyte compartment in SCID mice that received co-isogenic CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 1995; 154: 2678-2686.
148. Sydora BC, Habu S, Masaru Taniguchi. Intestinal intraepithelial lymphocytes preferentially repopulate the intestinal epithelium. *Int Immunol.* 1993; 7: 743-751.
149. Camerini V, Sydora BC, Aranda R, Nguyen C, MacLean C, McBride WH, Kronenberg M. Generation of intestinal mucosal lymphocytes in SCID mice reconstituted with mature, thymus-derived T cells. *J Immunol.* 1998; 160: 2608-2618.
150. Hamad M, Whetsell M, Klein JR. T cell precursors in the spleen give rise to

- complex T cell repertoires in the thymus and the intestine. *J Immunol.* 1995; 155: 2866.
151. Nakata S, Shirakura R, Ito T, Fukuzawa M, Miagawa S, Yanamoto S, Nozaki T, Matsumiya G, Izutani G, Matsuda H. Immunosuppressive mechanisms of deoxymethylspargualin and FK506 on in vitro cytotoxic lymphocytes. *Transplant Proc.* 1994; 26: S.1930-1933.
 152. Roelen DL, van Bree FP, Schanz U, van Rood JJ, Claas FH. Differential inhibition of primed alloreactive CTLs in vitro by clinically used concentrations of cyclosporine and FK506. *Transplantation.* 1993; 56: 190-195.
 153. Bland PW, Whiting CV. Induction of MHC class II gene products in rat intestinal epithelium during graft-versus-host disease and effects on the immune function of the epithelium. *Immunology.* 1992; 75: 366-371.
 154. Jadus MR, Wepsic HT. The role of cytokines in graft-versus-host reactions and disease. *Bone Marrow Transplant.* 1992; 10: 1-14.
 155. Yoshikai Y. The interaction of intestinal epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in host defense. *Immunol Res.* 1999; 20: 219-235.
 156. Nüssler NC, O'Brien J, Stange B, Platz KP, Neuhaus P, Mueller AR. IL-2 promotes the subset restoration of intraepithelial lymphocytes after ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2000; 32: 1305-1306.
 157. Peters M. Actions of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview. *Hepatology.* 1996; 23: 909-916.
 158. Gennari R, Alexander W, Eaves-Pyles T. IFN- γ decreases translocation and improves survival following transfusion and thermal injury. *J Surg Res.* 1994; 56: 530-536.
 159. Dignass AU, Sturm A, Becker A, Hotz A, Goebell H. Interferon- γ modulates intestinal epithelial cell function in vitro through a TGF β -dependent mechanism. *Z Gastroenterol.* 1998; Suppl. 1: 50-55.
 160. Feng HM, Popov VL, Walker DH. Depletion of gamma-interferon and tumor necrosis factor alpha in mice with *Rickettsia conorii*-infected endothelium:

- impairment of rickettsicidal nitric oxide production resulting in fatal overwhelming rickettsial disease. *Infect Immun.* 1994; 62: 1952-1960.
161. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon γ gene-disrupted mice. *J Exp Med.* 1993; 178: 2243-2247.
162. Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asachullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN- γ treatment. *Nature Med.* 1997; 3: 678-681.
163. Madara JL, Stafford J. Interferon- γ directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest.* 1989; 83: 724-727.
164. Car BD, Eng VM, Schnyder B, Ozmen L, Huang S, Gallay P, Heumann D, Aguet M, Ryffel B. Interferon γ receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J Exp Med.* 1994; 179: 1437-1444.
165. Robertson FM, Offner PJ, Ciceri DP, Becker WK, Pruitt BA. Detrimental hemodynamic effects of nitric oxide synthase inhibitors in septic shock. *Arch Surg.* 1994; 129: 149-156.
166. Gianotti L, Alexander JW, Pyles T, Fukushima R. Arginine-supplemented diets improve survival in gut-derived sepsis and peritonitis by modulating bacterial clearance. *Ann Surg.* 1993; 217: 644-654.
167. Roberts AI, O'Connell SM, Biancone L. Spontaneous cytotoxicity of intestinal intraepithelial lymphocytes: clues to the mechanism. *Clin Exp Immunol.* 1993; 94: 527-532.
168. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol.* 1997; 150: 823-832.
169. Caballero T, Nogueras F, Medina MT, Caracuel MD, de Sola C, Martinez-Salmerón FJ, Rodrigo M, Garcia del Moral R. Intraepithelial and lamina propria leucocyte subsets in inflammatory bowel disease: an immunohistochemical study of colon and rectal biopsy specimens. *J Clin*

- Pathol. 1995; 48: 743-748.
170. Müller S, Lory J, Corazza N, Griffiths GM, Z'graggen K, Mazzucchelli L, Kappeler A, Mueller C. Activated CD4⁺ and CD8⁺ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *Am J Pathol.* 1998; 152: 261-268.
171. Roman LI, Manzano L, de la Hera A, Abreu L, Rossi I, Alvarez-Mon M. Expanded CD4⁺CD45RO⁺ phenotype and defective proliferative response in T lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1996; 110: 1008-1019.
172. Neil GA, Summers RW, Cheyne BA, Carpenter C, Huang W-L, Waldschmidt TJ. Analysis of T-lymphocyte subpopulation in inflammatory bowel diseases by three-color flow cytometry. *Digestive Diseases and Sciences.* 1994; 39: 1900-1908.
173. Senju M, Hulstaert F, Lowder J, Jewell DP. Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut.* 1991; 32: 779-783.
174. Söderström K, Bucht A, Halapi E, Grönberg A, Magnusson I, Kiessling R. Increased frequency of abnormal $\gamma\delta$ T cells in blood of patients with inflammatory bowel diseases. *J Immunol.* 1996; 156: 2331-2339.
175. Kontiainen S, Scheinin T, Halme L. Number of activated T-helper cells and NK cells in peripheral blood is decreased in severe Crohn's disease. *APMIS.* 1996; 104: 355-361.
176. Wang P, Ba ZF, Ciotti WG, Bland KI, Chandry IH. Is the gut the "motor" for producing hepatocellular dysfunction after trauma and hemorrhagic shock? *J Surg Res.* 1998; 74: 141-148.
177. Massberg S, Messmer K. The nature of ischemia / reperfusion injury. *Transplant Proc.* 1998; 30: 4217-4223.
178. Horie Y, Wolf R, Miyasaka M, Anderson DC, Granger DN. Leukocyte adhesion and hepatic microvascular responses to intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Gastroenterology.* 1996; 111: 666-673.

179. Payne D, Kubes P. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. 1993; 265: G189-G195.
180. Unno N, Waung H, Menconi MJ, Tytgat SHA, Larkin V, Smith M, Morin MJ, Chavez A, Hodin RA, Fink MP. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology*. 1997; 113: 1246-1257.
181. Ward DT, Lawson SA, Gallagher CM, Conner WC, Shea-Donohue T. Sustained nitric oxide production via L-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res*. 2000; 89: 13-19.
182. Szabó A, Kaszaki J, Boros M, Nagy S. Possible relationship between histamine and nitric oxide release in the postischemic flow response following mesenteric ischemia of different durations. *Shock*. 1997; 7: 376-382.
183. Hutcheson IR, Whittle BJR, Boughton-Smith NK. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Br J Pharmacol*. 1990; 101: 815-829.
184. Chan KL, Zhang XH, Fung PCW, Guo WH, Tam PKH. Role of nitric oxide in intestinal ischemia-reperfusion injury studied using electron paramagnetic resonance. *Br J Surgery*. 1986; 11: 1427-1432.
185. Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*. 1999; 103: 129-135.
186. Woo Jacky, Iyer S, CornejoM-C, Mori N, Gao L, Sipos I, Maines M, Buelow R. Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32). *Transplant Immunol*. 1998; 6: 84-93.

8 ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

FACS	fluorescence activated cell sorting, Durchflußzytometrie
FSC	forward light scatter, Streuung des Lichts im Engwinkel
GALT	Gut associated lymph system
GSH	reduzierte Tripeptidform von Glutathion
GSSG	oxidierte Disulfidform von Glutathion
HO-1	induzierbare Isoform der Hämoxygenase
HSP	Heat-Shock-Protein
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN- γ	Interferon- γ
IL-2	Interleukin-2
IL-10	Interleukin-10
I/R	Ischämie / Reperfusion
I/RS	Ischämie / Reperfusionsschaden
LPL	Lamina propria Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharid
MLNL	Lymphozyten der mesenterialen Lymphknoten
NO	Nitric Oxide, Stickstoffmonoxid
NOS-2	induzierbare Isoform der Stickstoffmonoxidsynthase
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMN	periphere Blutlymphozyten

PPL	Lymphozyten der Peyerschen Plaques
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SSC	side scatter, Streuung des Lichts im rechten Winkel

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Chef und Lehrer, Herrn Prof. Dr. Peter Neuhaus für die freundliche Vergabe des Themas und seine fortwährende Unterstützung meines klinischen und wissenschaftlichen Werdegangs.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Richard Simmons für die Möglichkeit, als Research Fellow am Dept. of Surgery der University of Pittsburgh zwei Jahre forschen zu können. Während dieser zwei Jahre im Labor von Prof. Simmons hat mir besonders Dr. Rosemary Hoffman jederzeit mit Rat und Hilfe zur Seite gestanden, wofür ich ihr herzlich verbunden bin.

Ferner danke ich Doris Bergfeldt-Malinowski, Susanne Wojtke und Li-Gang Liu für die technische Unterstützung bei der Durchführung einiger Experimente. Nicht unerwähnt lassen möchte ich das Engagement von Julia O'Brian, die als Doktorandin eine große Hilfe bei den Untersuchungen zum Ischämie / Reperfusionsschaden war.

Die mühsame Aufgabe des Korrekturlesens dieser Arbeit haben dankenswerterweise meine Mutter Dr. Silvia Schattenfroh sowie meine Tante Dr. Gabriele Aumann übernommen.

Schließlich möchte ich allen nicht namentlich genannten Beteiligten, allen voran den Oberärzten der Klinik für Allgemein- Viszeral- und Transplantationschirurgie für ihre Kooperation und tatkräftige Unterstützung sowohl auf klinischem wie auf wissenschaftlichem Gebiet danken.

Der größte Dank gilt jedoch meinem Mann PD Dr. Andreas Nüssler, ohne dessen unermüdlichen Beistand und kritische Diskussion diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften, sowie die Literatur vollständig angegeben sind
- der Bewerberin die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift